

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Jan Šoch

Utilizace trehalózy u orchidejí: evoluce genů trehalázy

Utilization of trehalose in orchids: evolution of trehalase genes

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Jan Ponert

Konzultanti: doc. RNDr. Helena Lipavská, Ph.D., Mgr. Stanislav Vosolsobě

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 15. 8. 2017

Podpis:

Poděkování

Úvodem této práce bych chtěl poděkovat všem lidem, kteří mi pomáhali a podpořili mě během tvorby této práce. Zejména chci poděkovat mému školiteli RNDr. Janu Ponertovi za bezbřehou trpělivost a vstřícnost při konzultacích, provádění experimentů a sepisování této práce, a také za přátelskou atmosféru, která provázela společné dny a večery v laboratoři. Dále chci poděkovat konzultantům doc. RNDr. Heleně Lipavské, Ph.D. a Mgr. Stanislavu Vosolsobě, bez jejichž přispění by tato práce také nevznikla. Dále můj vděk patří členům laboratoří, ve kterých jsem se během tvorby této práce pohyboval, za jejich toleranci a mnohé rady. V neposlední řadě děkuji mým blízkým, jejichž podpora a shovívavost byly k dokončení této práce nezbytné. Vznik práce byl finančně podpořen agenturou GAUK v rámci projektu. č. 924516.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Literární úvod.....	3
2.1. Čeleď Orchidaceae	3
2.1.1. Semena orchidejí	3
2.1.2. Klíčení semen	4
2.1.3. Orchideoidně mykorhizní symbióza.....	5
2.1.3.1. Závislost orchideje na mykorhizní houbě	5
2.1.3.2. Průběh kolonizace mykorhizní houbou	6
2.1.3.3. Tok látek mezi symbionty v orchideoidní mykorhize	7
2.1.3.4. Transport látek v orchideoidní mykorhize.....	8
2.2. Trehalóza a trehalóza-6-fosfát	9
2.2.1. Biosyntéza trehalózy.....	10
2.2.2. Fylogeneze genů biosyntézy a degradace trehalózy.....	10
2.2.3. Úloha trehalózy v obraně proti abiotickému stresu	11
2.2.4. Úloha trehalóza-6-fosfátu a trehalózy v signalizaci	12
2.2.5. Utilizace trehalózy rostlinami.....	15
2.3. Trehaláza	17
2.3.1. Struktura a vlastnosti trehalázy	17
2.3.1.1. Inhibitory trehalázy.....	19
2.3.1.2. Regulace katalytické aktivity trehalázy.....	20
2.3.1.3. Buněčná lokalizace trehalázy.....	20
2.3.2. Význam trehalázy u rostlin.....	21
2.3.2.1. Úloha trehalázy ve stresových reakcích.....	21
2.3.2.2. Úloha trehalázy v energetickém metabolismu.....	22
2.3.2.3. Úloha trehalázy v reprodukci.....	23
2.3.2.4. Úloha trehalázy v symbiotických interakcích	24
3. Materiál a metody	26
3.1. Rostlinný materiál	26
3.2. Kultivační prostory	26
3.3. Přístroje a chemikálie	26
3.4. Kultivační média	26
3.4.1. Kultivační média – postup přípravy	27
3.5. Sterilizace nástrojů a materiálu.....	27
3.6. získání a zpracování rostlinného materiálu	28
3.6.1. Skladování semen a příprava na výsev	28

3.6.2. Sterilizace semen.....	28
3.6.2.1. Sterilizace semen čeledi Orchidaceae.....	28
3.6.2.2. Sterilizace semen čeledi Hypoxidaceae	29
3.6.2.3. Výsev a sterilizace nezralých semen druhu <i>Neuwiedia zollingerii</i>	30
3.6.3. Média použitá pro výsev rostlin	30
3.6.4. Zdokumentování a sklizení rostlinného materiálu	30
3.6.4.1. Stanovování klíčivosti a úmrtnosti semen	30
3.6.4.2. Fotodokumentace.....	31
3.6.4.3. Sklizení rostlinného materiálu	32
3.6.4.4. Analýza obrazu	32
3.6.5. Analýza obsahu sacharidů	33
3.6.5.1. Extrakce rozpustných sacharidů z rostlinného materiálu	33
3.6.5.2. Extrakce škrobu z rostlinného materiálu	34
3.6.5.3. Stanovení obsahu sacharidů	34
3.7. Práce s bakteriemi <i>Escherichia coli</i>	35
3.7.1. Média a kultivace	35
3.7.2. Transformace bakterií	35
3.8. Práce s nukleovými kyselinami	36
3.8.1. Izolace RNA.....	36
3.8.2. Přepis RNA do cDNA.....	36
3.8.3. Izolace DNA	37
3.8.4. Design primerů pro PCR	37
3.8.5. PCR	38
3.8.6. Izolace namnožených sekvencí	38
3.8.6.1. Elektroforéza.....	38
3.8.6.2. Izolace produktů z gelu	38
3.8.6.3. Ligace a zaklonování produktů.....	39
3.8.6.4. Výběr vhodných kolonií	39
3.8.6.5. Izolace plazmidu a sekvenace	39
3.9. Bioinformatické analýzy.....	39
3.10. Histochemické analýzy	40
3.10.1. Histolokalizace trehalózové aktivity.....	40
3.10.2. Vyhodnocení histochemických analýz.....	41
3.11. Statistická analýza.....	42
3.12. Grafy a tabulky	43
3.13. Design experimentů.....	44

3.13.1. Utilizace trehalózy protokormy orchidejí	44
3.13.2. Histolokalizace trehalázové aktivity.....	45
3.13.3. Sekvence trehalázových genů.....	46
3.13.4. Fylogeneze trehalázových genů.....	46
4. Výsledky.....	47
4.1. Utilizace trehalózy protokormy orchidejí.....	47
4.1.1. <i>Neuwiedia zollingerii</i>	47
4.1.2. <i>Paphiopedilum barbatum</i>	47
4.1.2.1. Klíčivost a úmrtnost <i>P. barbatum</i>	47
4.1.2.2. Velikost protokormů <i>P. barbatum</i>	49
4.1.3. <i>Paphiopedilum niveum</i>	50
4.1.3.1. Klíčivost a úmrtnost <i>P. niveum</i>	50
4.1.3.2. Velikost protokormů <i>P. niveum</i>	51
4.1.3.3. Relativní obsah vody <i>P. niveum</i>	53
4.1.3.4. Obsah rozpustných sacharidů a škrobu <i>P. niveum</i>	53
4.1.3.5. Obsah sacharidů v médiu <i>P. niveum</i>	55
4.1.4. <i>Thelymitra nuda</i>	57
4.1.4.1. Klíčivost a úmrtnost <i>T. nuda</i>	57
4.1.4.2. Velikost protokormů <i>T. nuda</i>	58
4.1.4.3. Relativní obsah vody <i>T. nuda</i>	59
4.1.4.4. Obsah rozpustných sacharidů a škrobu <i>T. nuda</i>	60
4.1.4.5. Obsah sacharidů v médiu <i>T. nuda</i>	62
4.1.5. <i>Diuris magnifica</i>	63
4.1.5.1. Klíčivost a úmrtnost <i>D. magnifica</i>	63
4.1.5.2. Velikost protokormů <i>D. magnifica</i>	65
4.1.5.3. Relativní obsah vody <i>D. magnifica</i>	66
4.1.5.4. Obsah rozpustných sacharidů a škrobu <i>D. magnifica</i>	66
4.1.5.5. Obsah sacharidů v médiu <i>D. magnifica</i>	68
4.1.6. <i>Ludisia discolor</i>	70
4.1.6.1. Klíčivost a úmrtnost <i>L. discolor</i>	70
4.1.6.2. Velikost protokormů <i>L. discolor</i>	71
4.1.6.3. Relativní obsah vody <i>L. discolor</i>	72
4.1.6.4. Obsah rozpustných sacharidů a škrobu <i>L. discolor</i>	73
4.1.6.5. Obsah sacharidů v médiu <i>L. discolor</i>	76
4.1.7. <i>Pleione maculata</i>	77
4.1.7.1. Klíčivost a úmrtnost <i>P. maculata</i>	77

4.1.7.2. Velikost protokormů <i>P. maculata</i>	78
4.1.7.3. Relativní obsah vody <i>P. maculata</i>	79
4.1.7.4. Obsah rozpustných sacharidů a škrobu <i>P. maculata</i>	80
4.1.7.5. Obsah sacharidů v médiu <i>P. maculata</i>	82
4.1.8. Čeleď Hypoxidaceae	83
4.1.8.1. <i>Hypoxis hemerocallideae</i>	83
4.1.8.2. <i>Hypoxis decumbens</i>	83
4.1.8.3. <i>Pauridia capensis</i>	84
4.2. Histolokalizace trehalózové aktivity	86
4.2.1. Výsledky histolokalizace trehalózové aktivity	86
4.2.1.1. <i>Paphiopedilum purpuratum</i>	86
4.2.1.2. <i>Ludisia discolor</i>	87
4.2.1.3. <i>Disa tripetaloides</i>	88
4.3. Sekvence trehalázových genů	90
4.3.1. Sekvence <i>Neuwiedia zollingerii</i>	90
4.4. Fylogeneze trehalázových genů	91
4.4.1. Fylogenetické vztahy sekvencí trehaláz podříše Embryophyta	91
5. Diskuze	100
5.1. Utilizace trehalózy protokormy orchidejí	100
5.1.1. <i>Neuwiedia zollingerii</i>	102
5.1.2. <i>Paphiopedilum barbatum</i>	102
5.1.3. <i>Paphiopedilum niveum</i>	103
5.1.4. <i>Thelymitra nuda</i>	105
5.1.5. <i>Diuris magnifica</i>	106
5.1.6. <i>Ludisia discolor</i>	107
5.1.7. <i>Pleione maculata</i>	108
5.1.8. Čeleď Hypoxidaceae	109
5.2. Histolokalizace trehalózové aktivity	110
5.3. Možné souvislosti s orchideoidně mykorhizní symbiózou	111
5.4. Evoluce trehalázových genů v rámci podříše Embryophyta	114
5.4.1. Trehalázové geny a utilizace trehalózy	117
6. Závěr	119
7. Seznam použité literatury	120
8. Přílohy	132

Seznam použitých zkratk

ABA	kyselina abscisová
AM	arbuskulárně mykorhizní symbióza
ANOVA	analýza rozptylu
ATAF1	transkripční faktor Arabidopsis activating factor 1
BLAST	basic local alignment search tool
bZIP11	transkripční faktor Basic leucine zipper 11
CAM metabolismus	metabolismus některých rostlin, včetně některých orchidejí (z angl. crassulacean acid metabolism)
CaMK	Ca ²⁺ kalmodulindependentní kináza
CCCP	cyanide m-chlorophenyl hydrazone
CDKA	cyklin-dependentní kináza A
cDNA	komplementární DNA
dNTP	deoxynukleotidtrifosfáty
DPI	diphenyleneiodonium chlorid
ECM	ektomykorhizní symbióza
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EST	krátké sekvence získané z mRNA (z anglického expressed sequence tags)
FTY	Fisherův exaktní test s Yatesovou korekcí na spojitost
GA3	kyselina giberelová
GOX	glukózaoxidáza
GPI kotva	glykosilfosfatidylinositolová kotvu
ITS	oblasti mezi geny v ribozomální DNA (z angl. Internal transcribed spacer)
KCA1	kinezin interagující s CDKA
Km	Michaelisova-Mentenové konstanta
KW	Kruskalův-Wallisův test
MC test	test mnohonásobného porovnání
miRNA	microRNA
mRNA	messenger RNA
n	počet objektů
NBT	nitrobluetetrazolium

NCED3	enzym biosyntézy ABA (NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE3)
nd	počet Petriho misek
NDA	hierarchická analýza rozptylu
NuBP	nukleotid-vazebný protein (z angl. nucleotid binding protein)
OrM	orchideoidně mykorhizní symbióza
OWA	jednocestná ANOVA
PFA	paraformaldehyd
PLB	somatická embrya orchidejí (z angl. protocorm-like bodies)
PMS	fenazin methosulfát
PVP-40	polyvinylpyrrolidon, průměrná molární hmotnost 40000 g/mol
RNAi	RNA interference
rpm	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
RWC	relativní obsah vody (z angl. relative water content)
SD	směrodatná odchylka (z angl. standard deviation)
SMG	SMS médium s glukózou
SMK	SMS médium bez přidaných sacharidů
SMS	médium pro kultivaci rostlin
SMT	SMS médium s trehalózou
SnRK1	kináza (z angl. sucrose non fermenting related kinase 1)
SoPo pufr	pufr (z angl. sodium phosphate)
TAE	tris-acetát-EDTA
TPP	trehalózafosfátfosfatáza
TPS	trehalózafosfátsyntáza
UDP	uridindifosfát
UDPG	UDP-glukóza
WFT	Welchův F-test
WRS	Wilcoxonův test

Abstrakt

U všech doposud studovaných druhů orchidejí bylo pozorováno, že se účastní orchideoidně mykorhizní symbiózy. Tato symbióza zároveň představuje naprosto nezbytnou součást životního cyklu orchidejí. Mezi symbionty přitom dochází k výměně látek, kde orchidej alespoň v jejích časných vývojových stádiích získává uhlíkaté látky a energii od houby. Tato práce se soustředí na možnou úlohu trehalózy jako látky přenášené v této symbióze. V *in vitro* experimentech bylo ukázáno, že trehalózu jsou schopni využít srovnatelně se sacharózou a glukózou zástupci tří podčeledí orchidejí. Schopnost utilizace trehalózy se tak zdá být v rámci této čeledi konzervovaná. Histochemickými metodami byla lokalizována aktivita enzymu trehalázy v mykorhizách orchidejí. Tato aktivita silně kolokalizovala s kolonizovanými oblastmi kořenů orchidejí. Trehalóza je tak patrně mezi symbionty transportována a v tomto procesu hraje klíčovou roli trehaláza. Pomocí bioinformatických metod bylo nalezeno mnoho duplikací trehalázového genu v rámci podříše Embryophyta, včetně některých orchidejí. Zajímavé je, že nejvíce trehalázových genů bylo nalezeno v genomu orchideje *Dactylorhiza majalis*. Utilizace trehalózy, zvýšená trehalázová aktivita v mykorhizách a duplikace trehalázových genů u některých orchidejí dohromady naznačují, že přenos trehalózy v orchideoidní mykorhize pravděpodobně probíhá a mohl by být výsledkem koevoluce orchidejí a hub.

Klíčová slova: Orchidej, mykorhizní symbióza, trehalóza, trehaláza, genová duplikace, utilizace sacharidů, metabolismus

Abstract

All orchid species studied so far have been shown to participate in orchideoid mycorrhizal symbiosis. Moreover, this symbiosis is absolutely vital component of their life cycle. Exchange of nutrients occurs between symbionts where the fungi provides the orchid with energy and carbon supply at least in its early developmental stages. This study focuses on the possible role of trehalose in this transfer. *In vitro* experiments have showed in five species from three different subfamilies of Orchidaceae family that they can utilize trehalose comparably with sucrose and glucose. Thus, the ability of trehalose utilization seems to be conserved among orchids. Trehalase enzyme activity was localized histochemically in orchid mycorrhizas. The activity strongly colocalized with colonized tissue supporting a hypothesis that trehalose transfer occurs in this site and is mediated by trehalase. Using bioinformatic methods, trehalase gene duplications were identified in many taxons of Embryophyta including three orchid species. Interestingly, highest number of trehalase gene copies was identified in genome of orchid *Dactylorhiza majalis*. Trehalose utilization, high trehalase activity in mycorrhizas and trehalase gene duplications in some orchids together indicate that trehalose transfer in orchid mycorrhizas probably occurs and is likely to be result of coevolution of orchids and fungi.

Key words: Orchid, mycorrhizal symbiosis, trehalose, trehalase, gene duplication, carbohydrate utilization, metabolism

1. Úvod

Mykorhizní symbióza, tedy soužití hub a rostlin, je nejrozšířenějším typem symbiózy vyšších rostlin s jinými organismy. Podle odhadů se této symbiózy účastní až 90% druhů vyšších rostlin (Selosse & Le Tacon, 1998; Brundrett, 2009). Je tedy zřejmé, že mykorhizní symbióza je zásadním hybatelem v rámci většiny ekosystémů, a že jejím pochopení je nutné k osvětlení další funkční závislosti v těchto ekosystémech. Vztah mezi houbovým a rostlinným symbiontem je velice komplexně regulován a lze předpokládat, že koevoluce obou partnerů dala vzniknout složité signalizační síti, kontrolující mechanismy, jakými na sebe symbionti vzájemně působí (Kohler *et al.*, 2015). Jedním z vhodných modelů pro studium mykorhizní symbiózy jsou orchideje (čeleď Orchidaceae), jejíž zástupci se účastní tzv. orchideoidně mykorhizní symbiózy. Z hlediska ontogeneze orchidejí je nápadný fakt, že tyto rostliny nejsou v přírodě schopny bez symbiózy s mykorhizní houbou dokončit svůj životní cyklus. Semena orchidejí obsahují velice malé množství zásobních látek a vývoj rostliny je tak alespoň do doby, než začne aktivně fotosyntetizovat, limitován přísunem živin ze strany houbového symbionta (Smith, 1973; Hadley, 1984; Cameron *et al.*, 2006). Dospělé orchideje mohou pak být autotrofní, mixotrofní, či plně mykoheterotrofní. Směr toku živin se u dospělých orchidejí může otočit a rostlina pak vyživuje symbiotickou houbu (Cameron *et al.*, 2006, 2008).

O komunikaci mezi rostlinným a houbovým symbiontem v současné chvíli příliš známo není. Je však logické se domnívat, že dochází k oboustrannému přenosu širšího spektra látek, které působí na signalizační systémy rostliny i houby. Jako jedny z potenciálně nejzajímavějších látek lze označit sacharidy. Mezi sacharidy, které mají potenciál být takto transportovány, je nápadná trehalóza.

Jedná se o neredukující disacharid s velice širokým uplatněním v téměř celé živé přírodě. Co je na něm však z hlediska mykorhizní symbiózy tím nejpozoruhodnějším, je rozkol úloh tohoto sacharidu u rostlin a u hub. U rostlin se trehalóza vyskytuje většinou v nanomolárních množstvích a plní zde signální úlohu (Carillo *et al.*, 2013; Yadav *et al.*, 2014), zatímco u hub se trehalóza vyskytuje v množstvích milimolárních a slouží u nich jako energetická molekula (Wannet *et al.*, 2000). Část rostlin patrně není schopna trehalózu využít (Veluthambi *et al.*, 1982b; Delatte *et al.*, 2011) což kontrastuje s pozorovanou utilizací trehalózy u orchidejí (Ernst *et al.*, 1971; Jheng *et al.*, 2006), která je nejspíše dána jejich obligátně mykoheterotrofní fází vývoje a je pravděpodobné, že protokormy orchidejí získávají z mykorhizní houby jako zdroj energie právě trehalózu.

Cíle práce

Tato práce si klade za cíl zlepšit porozumění vztahů mezi symbionty v orchideoidní mykorhizní symbióze a přispět tak k pochopení fenoménu mykorhizní symbiózy obecně. Především je pak práce orientována k vysvětlení způsobu utilizace trehalózy u různých podčeledí orchidejí.

Hlavní cíl:

Zjistit, jakým způsobem je řešena utilizace trehalózy u různých podčeledí orchidejí.

Dílčí cíle:

- *Ověřit schopnost utilizace trehalózy vybraných druhů orchidejí.*
- *Zjistit, zda může vznik mykorhizy u orchidejí stimulovat trehalázovou aktivitu.*
- *Získat sekvence trehalázy u zástupců všech podčeledí čeledi Orchidaceae.*
- *Rekonstruovat fylogenezi trehalázových genů v rámci podříše Embryophyta z dostupných a získaných databází.*

Hypotézy:

- I. Schopnost utilizovat trehalózu je v rámci čeledi Orchidaceae ustálená.*
- II. Vznik mykorhizy stimuluje u orchidejí trehalázovou aktivitu.*
- III. K multiplikaci trehalázových genů došlo v rámci čeledi Orchidaceae pouze v podčeledi Orchidoideae.*
- IV. Multiplikace trehalázových genů u orchidejí není v rámci podříše Embryophyta ojedinělá.*

2. Literární úvod

2.1. Čeleď Orchidaceae

Orchideje, tedy čeleď vstavačovitě (Orchidaceae) se řadí mezi druhově vůbec nejbohatší čeledi rostlin – čítá celkově více než 25000 druhů a představuje tak skoro desetinu všech dosud popsáných druhů rostlin (WCSP, 2017). Taxonomicky se čeleď Orchidaceae řadí do řádu Asparagales, tedy mezi jednoděložné (Monocotyledonae), krytosemenné rostliny (Magnoliophyta, dle APG IV, Chase *et al.*, 2016). Čeleď vstavačovitě se vnitřně dělí do pěti oddělených skupin, podčeledí Apostasioideae, Vanilloideae, Cypripedioideae, Epidendroideae a Orchidoideae; taxonomie orchidejí a obzvláště některých skupin je přitom poměrně problematická (Pridgeon *et al.*, 1999). Rozšíření orchidejí je velice široké, vyskytují se na všech kontinentech kromě Antarktidy a obzvláštní diverzitu mají v deštných pralesech (Fay & Chase, 2009). Pokud jde o životní formu, jsou orchideje vytrvalé byliny a mohou být dále rozděleny na epifyty, litofyty a terestrické druhy (Arditti, 1992).

Důležitým specifikem orchidejí je jejich velká diverzita. Jedním z hlavních důvodů pro tak výraznou diverzifikaci taxonů orchidejí je pravděpodobně silná vazba rozmnožování orchidejí na specifické opylovače a s tím spojená koevoluce orchidejí a opylovačů. Ta vedla u orchidejí ke vzniku řady rozmnožovacích strategií a morfologických struktur, které dále stimulují radiaci druhů. Jde zejména o tvorbu brylek a šálivých květů (Givnish *et al.*, 2015) či analogů feromonů hmyzu (Brodmann *et al.*, 2009). Dalšími faktory stojícími za diverzifikací orchidejí jsou například epifytismus či CAM metabolismus (z angl. Crassulacean acid metabolism; Givnish *et al.*, 2015). Další možnou příčinou je proces částečné endoreduplikace zastoupený u některých orchidejí (Hřibová *et al.*, 2016). Velice důležitou hnací silou evoluce orchidejí je ovšem jejich koevoluce s houbami, respektive orchideoidně mykorhizní symbióza. Vztahy mezi symbionty jsou zde často druhově specifické a závisí i na podmínkách prostředí (Johnson *et al.*, 1997). Orchideoidně mykorhizní symbióza je přitom pro všechny druhy orchidejí alespoň v časných fázích jejich vývoje zcela nezbytná (Smith & Read, 2008).

2.1.1. Semena orchidejí

Stavba semen orchidejí je mezi ostatními rostlinami velice neobvyklá. Semena orchidejí jsou totiž zpravidla velice malá a mají charakter tzv. prachových semen, z angl. „dust seeds“. Tato semena mají často protáhlý tvar s délkou pod 1 mm (Arditti & Ghani, 2000). Například pro některé severoamerické terestrické orchideje byly naměřeny hodnoty v rozmezí $0,07-0,4 \times 0,10-1,97$ mm (Harvais, 1974; Healey *et al.*, 1980).

S malou velikostí se pojí i nízká váha semen, která se pohybuje přibližně mezi 1-8 μ g a je často zmenšena tím, že velká část objemu semene je tvořena vzduchem (Rasmussen, 1995; Arditti & Ghani, 2000). Orchideje přitom semen produkují fascinující množství. Například u rodu *Maxillaria* může jedna rostlina vyprodukovat až 10 miliónů semen (Darwin, 1904), což jak spočítali J. Arditti a A. Ghani (2000), by teoreticky

od jedné rostliny ve čtyřech generacích znamenalo vyprodukovaní 144×10^{36} semen. Tyto vlastnosti semen orchidejí souvisí částečně i s jejich možným šířením vodou či vzduchem (Arditti & Ghani, 2000). Především jsou ale prachová semena společným znakem mykoheterotrofních a parazitických druhů rostlin a tedy důsledkem konvergentní evoluce. Patrně z toho důvodu, že chybějící zásobní látky semenům a semenáčkům těchto rostlin nahrazuje dodávka živin od symbionta (Leake, 1994; Whigham *et al.*, 2008; Johansson *et al.*, 2014).

Semena orchidejí tedy obsahují zpravidla jen málo vyvinuté embryo a velice malé množství zásobních látek (Rasmussen, 1995). Embryo obsažené ve zralém semeni bývá často jen ve fázi globulární, přičemž embryo se mezidruhově liší například přítomností suspensoru a některá vytvářejí i dělohy (Veyret, 1974; Lee *et al.*, 2006). Charakteristickým znakem semen orchidejí také je, že zpravidla neobsahují endosperm (Clements, 1995). Celé semeno se tedy skládá pouze z embrya a osemení, které je u zralých semen odumřelé (Rasmussen, 1995). Přesto ale embryo semen obsahují malá množství zásobních látek, přičemž nejčastěji jde o zásobní lipidy a proteiny (Carlson, 1940; Harrison, 1977; Manning & Van Staden, 1987; Rasmussen, 1990; Richardson *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 2007). U některých druhů mohou obsahovat také nezanedbatelné zásoby ve formě škrobu (Harvais, 1974; Tian *et al.*, 1985; Guo & Xu, 1990). Semena orchidejí obsahují také malé množství rozpustných sacharidů, přičemž dominantním cukrem obsaženým v semenech se zdá být sacharóza (Manning & Van Staden, 1987; Ponert, 2009). Ačkoliv tedy semena orchidejí obsahují určité množství rezervních látek, je pro jejich vývoj v dospělou rostlinu nutná interakce s mykorhizní houbou či v podmínkách *in vitro* dodání exogenního zdroje energie (Smith & Read, 2008). Semena jsou kryta jednou, nebo dvěma vrstvami osemení (Clements, 1995; Arditti & Ghani, 2000).

2.1.2. Klíčení semen

Klíčení semen orchidejí je vzhledem k minimálnímu množství zásobních látek v nich obsažených přísně regulované. Předčasnému klíčení semen orchidejí brání osemení, které je zodpovědné za tzv. fyzikální dormanci semen. Tuto bariéru klíčení je možné odstranit například ošetřením ethanolem nebo chlornanem vápenatým (Ponert *et al.*, 2011). V přírodě je pravděpodobně tato bariéra narušována mykorhizními houbami (Gryndler *et al.*, 2004). Osemení ovšem nepředstavuje jedinou překážku klíčení semen orchidejí. Semeno má ještě tzv. fyziologickou dormanci, která může mít více příčin. Fyziologická dormance může být u některých druhů orchidejí narušena stratifikací semen (Rasmussen, 1992). Jedním z možných mechanismů fyziologické dormance semen orchidejí je například akumulace kyseliny abscisové (Lee *et al.*, 2007), kdy po vzniku mykorhizy může docházet k výrazným změnám v příjmu a zpracování signálu tohoto fytohormonu (Chen *et al.*, 2017). Po narušení dormance semene dochází k dalšímu vývoji jedince v něm obsaženém. Jelikož je však tento vývoj nezávislý na mateřské rostlině, hovoří se zde o ontogenezi, ačkoliv dochází nejprve *de facto* k dalším krokům embryogeneze. Od okamžiku vyklíčení jsou poté embryo orchidejí nazývána speciálním termínem protokormy (Pridgeon *et al.*, 1999). Podobně jako prachová semena, jsou pravděpodobně i protokormy strukturami do značné míry souvisejícími s mykoheterotrofním stádiem

vývoje rostliny; vznikly opakovaně u velice vzdálených taxonů rostlin a jsou tedy nejpíše produktem konvergentní evoluce (Leake *et al.*, 2008). Vzniku protokormu nejprve předchází zvětšování buněk embrya následované jejich dělením (Rasmussen, 1990). V určité fázi dojde zvětšováním objemu embrya k protržení osemení a od této chvíle je útvar nazýván protokormem, který je u orchidejí v podstatě obdobou klíčnicí rostliny. Buňky protokormu dále procházejí intenzivním dělením a postupně diferencují základy orgánů. Prvními zřetelnými strukturami na protokormu jsou zpravidla tzv. vlásky (z angl. rhizoids). V bazální oblasti se vytváří mykotrofní pletivo, tedy pletivo určené ke kolonizaci mykorhizní houbou, a v apikální oblasti chalázy dochází k odlišení buněk meristému (Rasmussen, 1990; Pereira *et al.*, 2015). Časná vývojová stadia orchidejí jsou ale zcela závislá na interakci s mykorhizní houbou a ustanovení orchideoidní mykorhizy, o které bude pojednáno nyní.

2.1.3. Orchideoidně mykorhizní symbióza

Všechny doposud studované druhy orchidejí se účastní orchideoidně mykorhizní symbiózy a panuje obecný názor, že se této symbiózy účastní všechny orchideje. Vzhledem k tomu, že orchideje představují přibližně 10 % druhů rostlin, můžeme považovat orchideoidní mykorhizní symbiózu (OrM) za druhou nejčastější hned po mykorhize arbuskulární (Brundrett, 2009). Podobně jako arbuskulárně mykorhizní symbióza, řadí se i OrM mezi endomykorhizní symbiózy. Od ostatních typů endomykorhizních symbióz se OrM odlišuje zejména specifickými strukturami, a do značné míry také zúčastněnými druhy mykorhizních hub (Ogura-Tsujita *et al.*, 2012). V tomto bodě je nutné zmínit, že jsou rozlišovány základní typy OrM. Tím podstatně vzácnějším je typ ptyofágní. U tohoto typu dochází k lyzi pletiv určených k akomodaci mykobionta a hyfy jsou zde degradovány jednotlivě (Leake, 1994; Wang *et al.*, 1997; Gryndler *et al.*, 2004). Drtivá většina orchidejí tvoří tzv. tolypofágní typ OrM (Leake, 1994), a zejména o tomto typu OrM bude v následujícím textu pojednáváno.

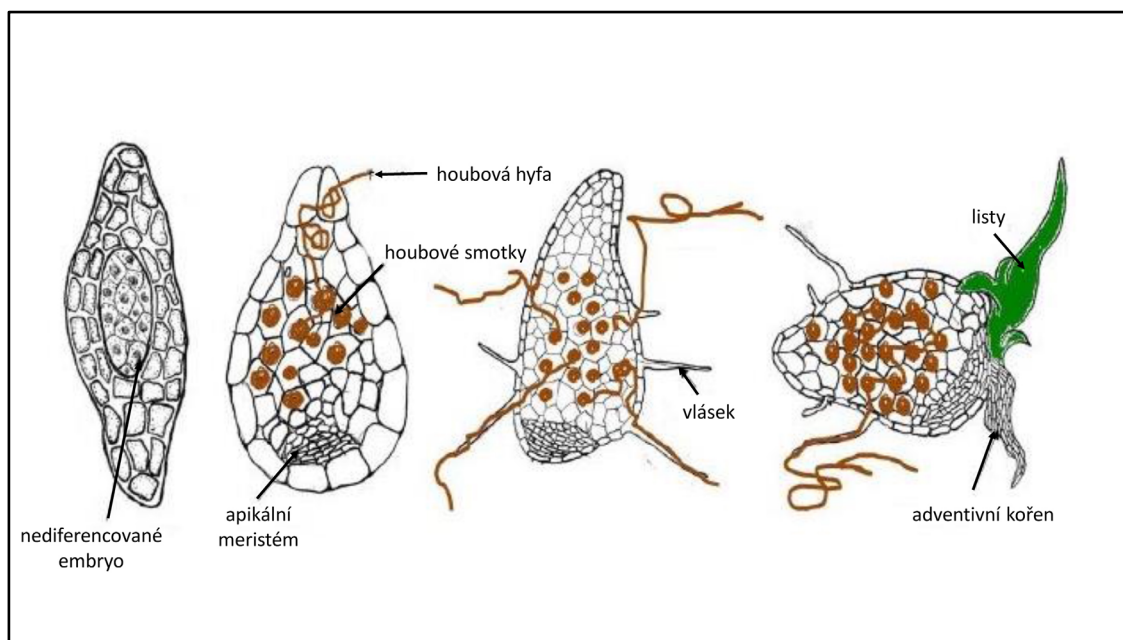
2.1.3.1. Závislost orchideje na mykorhizní houbě

Jak bylo uvedeno výše, časná vývojová stadia orchidejí jsou ve svém vývoji zcela závislá na kolonizaci mykorhizní houbou či dodání vhodného zdroje energie do média, tedy obecně na externím zdroji energie a v přírodě jsou tak tato stadia obligátně mykoheterotrofní. Poté, co klíčnicí rostlina orchideje vytvoří fotosyntetická pletiva a započne fotosyntetizovat, může se stát na houbě zcela nezávislou a tedy autotrofní (Alexander & Hadley, 1985). Jen menší část druhů orchidejí zůstává po celý svůj život plně závislá na mykorhizní houbě; tyto druhy se označují jako obligátně mykoheheterotrofní (Leake, 1994). Naproti tomu velká část druhů orchidejí pravděpodobně kombinuje příjem uhlíku a energie od houby a asimilaci uhlíku fotosyntézou; v případě těchto druhů se jedná o mixotrofní způsob výživy (Girlanda *et al.*, 2011; Sommer *et al.*, 2012; Stöckel *et al.*, 2014). Zajímavostí je, že u některých autotrofních a mixotrofních druhů orchidejí často vznikají achlorofylní „albinotičtí“ jedinci, kteří jsou plně mykoheterotrofní (Julou *et al.*, 2005; Chen *et*

al., 2017). Tato velká diverzita ve způsobu výživy je specifickým znakem orchidejí a orchideje tak představují velice vhodný model pro studium různých forem výživy rostlin. Úplná závislost časných vývojových stádií orchidejí má velice zásadní vliv na ekologii a potažmo evoluci orchidejí (Givnish *et al.*, 2015). Některými autory bývá dokonce interakce protokormů orchidejí s mykorhizními houbami odlišována od interakce kořenů dospělých orchidejí s mykorhizními houbami pod názvem „mykorhiza klíčících rostlin orchidejí“ (z angl. orchid seedling mycorrhiza) a bylo spekulováno, že tato forma interakce může být oproti druhé zmíněné evolučně původní (Rasmussen & Rasmussen, 2014).

2.1.3.2. Průběh kolonizace mykorhizní houbou

První interakce orchideje s mykorizní houbou probíhá většinou ve fázi nabobtnalého embrya (Richardson *et al.*, 1992). Důležitým předpokladem pro úspěšné ustanovení OrM je zde pravděpodobně změna charakteru buněk určených ke kolonizaci. Jde zejména o vakuolizaci buněk a zvyšování jejich ploidie procesem endoreduplikace (Williamson & Hadley, 1969; Rasmussen, 1990). Penetrace protokormů probíhá alespoň u dosud pozorovaných druhů nejčastěji skrze pól suspensoru a skrze vlásky protokormů (obrázek 2.1.; Williamson & Hadley, 1970; Rasmussen, 1990; Pereira *et al.*, 2015). V případě, že suspensor chybí, prorůstají hyfy skrze bazální pól embrya (Pridgeon *et al.*, 2003). Penetrace kořenů dospělých rostlin probíhá skrze kořenové vlásky či přímo skrze pokožku (Sathiyadash *et al.*, 2012).



Obrázek 2.1. Sekvence událostí od klíčení semene orchideje, přes vznik protokormu a jeho kolonizaci mykorhizní houbou, po vznik rostliny s orgány (podle Peterson *et al.*, 2004).

V další fázi kolonizace dochází k vývoji charakteristických struktur. Mykorhizní houba proniká pletivou rostliny skrze buňky, aniž by penetrovala plasmalemu, jedná se o tzv. symplastický růst, ačkoliv jde o poněkud zavádějící pojem.

V některých buňkách rostliny se začínou houbové hyfy větvit a anastomozovat a vytvářet tzv. smotky, neboli peletony (viz obrázek 2.1.). Právě smotky jsou přitom nejspíše hlavním místem výměny látek mezi symbionty. Stále ovšem není zcela znám mechanismus, jakým výměna látek mezi symbionty probíhá. Smotky jsou totiž po určité době degradovány a následně narůstají nové smotky.

Lze tedy předpokládat dvě možné cesty přenosu, tzv. biotrofní a nekrotrófní. Biotrofní cesta představuje přenos látek z živých hyf bez porušení smotků a jejich degradace, jaký byl pozorován u druhu švihlíku *Spiranthes sinensis* (Kuga *et al.*, 2014). Nekrotrófní cesta představuje přenos látek skrze degradaci houbových smotků, jaký pravděpodobně probíhá u druhu *Rhizanthella gardnerii* (Bougoure *et al.*, 2010, 2014) a spolu s biotrofním přenosem i u zmíněného švihlíku *S. sinensis* (Kuga *et al.*, 2014). Pravděpodobně je tedy typ výměny látek druhově specifický, nemůže však být vyloučeno že může být dán i podmínkami prostředí, či vývojovou fází symbiontů, a je možné, že dochází ke kombinaci obou typů výměny u jedné rostliny. Buňky obsahující smotky se podle struktury smotků někdy označují jako buňky hostitelské, tj. obsahující neporušené smotky, a jako buňky stravovací, tj. obsahující odumřelé smotky (Gryndler *et al.*, 2004). Životnost smotků zpravidla není příliš dlouhá, k jejich degradaci může dojít i během jednoho dne od počátku kolonizace (Rasmussen, 1990), v některých případech mohou ale smotky vydržet intaktní například až devět dní (Bougoure *et al.*, 2014).

2.1.3.3. Tok látek mezi symbionty v orchideoidní mykorhize

Přenos látek mezi symbionty v orchideoidní mykorhize je stále málo probádáný a zůstává předmětem diskuze. V rámci orchideoidní mykorhizy patrně dochází k přenosu vody z houby do rostliny, což má patrně zásadní úlohu v klíčení semen orchidejí (Yoder *et al.*, 2000). Stejným směrem je patrně transportován také fosfor (Alexander & Hadley, 1984; Alexander *et al.*, 1984) a společně s ním dusík (Alexander & Hadley, 1984). Přesun minerálních látek ve stejném směru a zejména právě fosforu a dusíku je dobře znám u arbuskulární a erikoidní mykorhizy, nebo ektomykorhizy (přehled např. Gryndler *et al.*, 2004). Specifikem orchideoidní mykorhizy je oproti zmíněným symbiózám zejména směr přesunu uhlíku a energie. Z předchozích kapitol je zcela zřejmé, že alespoň v časných vývojových stádiích orchidejí je vztah pro mykorhizní houbu nevýhodný – semeno neobsahuje téměř žádné zásobní látky a naopak vyžaduje pro svůj vývoj značnou investici energie ze strany houby. V tomto případě je namístě mluvit o parazitismu ze strany orchideje (citace). Zjevně nevýhodný je pro houbu i vztah se zmíněnými mykoheterotrofními druhy orchidejí, či albinotickými formami některých druhů. Tok uhlíku a energie směřuje v těchto případech z houbového do rostlinného symbionta (Smith, 1967; Julou *et al.*, 2005; Bougoure *et al.*, 2010; Gebauer *et al.*, 2016). Jaká je ovšem situace u rostlin orchidejí, které fotosyntetizují? U jiných typů mykorhizní symbiózy, kterých se účastní fotosyntetizující rostliny, jako je arbuskulárně a erikoidně mykorhizní, či ektomykorhizní symbióza, dochází k přesunu uhlíku ve směru z rostlinného symbionta do houbového symbionta (Lewis & Harley, 1965a; Stribley & Read, 1974; Johnson *et al.*, 2002). U některých fotosyntetizujících orchidejí s největší pravděpodobností ovšem dochází v různé míře k přesunu uhlíkatých látek směrem z houbového

do rostlinného symbionta (Smith, 1967; Hadley & Purves, 1974; Alexander & Hadley, 1985). Novější studie provedená na smrkovníku (*Goodyera repens*) v podstatně lépe kontrolovaných podmínkách, než poslední zmíněné studie, ukázala, že u dospělé orchideje se může směr toku uhlíkatých látek otočit a a uhlíkaté látky a energie jsou poté transportovány téměř výhradně směrem z rostlinného do houbového symbionta (Cameron *et al.*, 2006). Z tohoto pohledu by tedy byla OrM u dospělé rostliny mutualistickou interakcí s houbovým symbiontem. Jak je ale patrné, nelze v tuto chvíli kvůli malému množství studií zobecňovat a charakter této symbiózy je stále velice nejasný. Zcela jistě je ale závislost orchideje na mykorhizní houbě dána její životní fází a může být dána podmínkami prostředí (Johnson *et al.*, 1997). Co do charakteru symbiózy může jít jak o parazitismus ze strany rostliny, tak ze strany houby, či o mutualismus (Gryndler *et al.*, 2004). Ústřední otázkou této práce je ovšem přenos látek zejména ve směru houbový symbiont → rostlinný symbiont, který ostatně vždy převažuje alespoň v časných vývojových stádiích orchidejí. Z tohoto pohledu je stěžejní způsob, jakým jsou látky v tomto směru v orchideoidní mykorhize přenášeny a charakter přenášených látek.

2.1.3.4. Transport látek v orchideoidní mykorhize

Způsob, jakým jsou látky v orchideoidní mykorhize transportovány, je do velké míry neznámý. S největší pravděpodobností dochází jak u ptyofágní (viz výše), tak tylopořágní formy k přenosu látek endocytotickými váčky (Barroso & Pais, 1987), který patrně souvisí zejména s nekrotrófním způsobem výměny látek. Transport ale s největší pravděpodobností probíhá i přes membránové přenašeče a tento by pak byl nejspíše hlavním mechanismem biotrofní výměny látek (citace). Membrána, která odděluje houbové smotky a protoplast rostlinných buněk má velmi specifické vlastnosti a nazývá se perifungální membrána. Na přenos zprostředkovaný přenašeči ukazuje například pozorovaná změna v aktivitě ATPáz na této membráně u infikovaných buněk druhu postromice *Epidendrum ibaguense* (Serrigny & Dexheimer, 1985). Hlavní transportované látky směrem z houbového do rostlinného symbionta jsou patrně uhlíkaté látky (Smith, 1966, 1967; Alexander & Hadley, 1985; McKendrick *et al.*, 2000). Mezi přenášenými látkami přitom pravděpodobně hrají dominantní roli sacharidy (Smith, 1966; Lewis & Smith, 1967). U druhu prstnatce *Dactylorhiza purpurella* (uvedený jako *Dactylorchis purpurella*) z podčeledi Orchidoideae byl zaznamenán přesun značeného uhlíku z [¹⁴C]glukózy dodané extraradikálnímu mycéliu mykorhizní houby zpočátku zejména do trehalózy a po nějaké době následoval přesun značeného uhlíku do sacharózy. Tyto výsledky tak poměrně přesvědčivě ukazují, že hlavním transportovaným sacharidem je v tomto případě trehalóza (Smith, 1967). Je však nutné dodat, že analýza značení byla provedena na směsi houbového a rostlinného materiálu a tak není zřejmé, jakým způsobem transport probíhal. Jednou možností je přesun houbové trehalózy do rostliny, druhou pak příjem glukózy vzniklé štěpením houbové trehalózy. Na utilizaci houbové trehalózy orchidejemi v OrM ale ukazuje například také rozdíl v obsahu trehalózy u hub a u rostlin. Mykorhizní houby zpravidla obsahují velká, většinou milimolární množství trehalózy (Lewis & Harley, 1965b; Smith, 1966, 1967; Wannet *et al.*, 2000). Naproti tomu rostliny trehalózy většinou obsahují jen malá,

zpravidla nanomolární množství (Lunn *et al.*, 2006; Carillo *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2016). To by mohlo rostlinám orchidejí například pomáhat s udržováním uhlíkového sinku v mykorhizních pletivech. U většiny rostlin nicméně podle většiny odborné literatury externě dodaná trehalóza disbalancuje velmi jemně vyváženou sacharidovou signalizaci a v odborné literatuře bývá často opakováno, že na rostliny působí exogenní trehalóza toxicky (Paul *et al.*, 2008). Naproti tomu orchideje jsou patrně schopny externě dodanou trehalózou využít, ačkoliv existuje jen minimum informací, jakým způsobem ovlivňuje jejich metabolismus (Ernst *et al.*, 1971; Smith & Smith, 1973; Hadley & Purves, 1974; Jheng *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Sopalan *et al.*, 2010). Z tohoto pohledu by tak utilizace trehalózy u orchidejí měla být v ústředí zájmu výzkumu OrM, stejně tak, jako enzym s největší pravděpodobností zodpovědný za degradaci trehalózy – trehaláza. O významu trehalózy a trehalázy u rostlin budou pojednávat následující kapitoly. Téma trehalázy bude rozvedeno poněkud podrobněji, a to z toho důvodu, že v současnosti neexistuje žádný přehledový článek věnující se trehaláze u rostlin a velká část výzkumu trehalózového metabolismu u rostlin možnou úlohu trehalázy opomíjí.

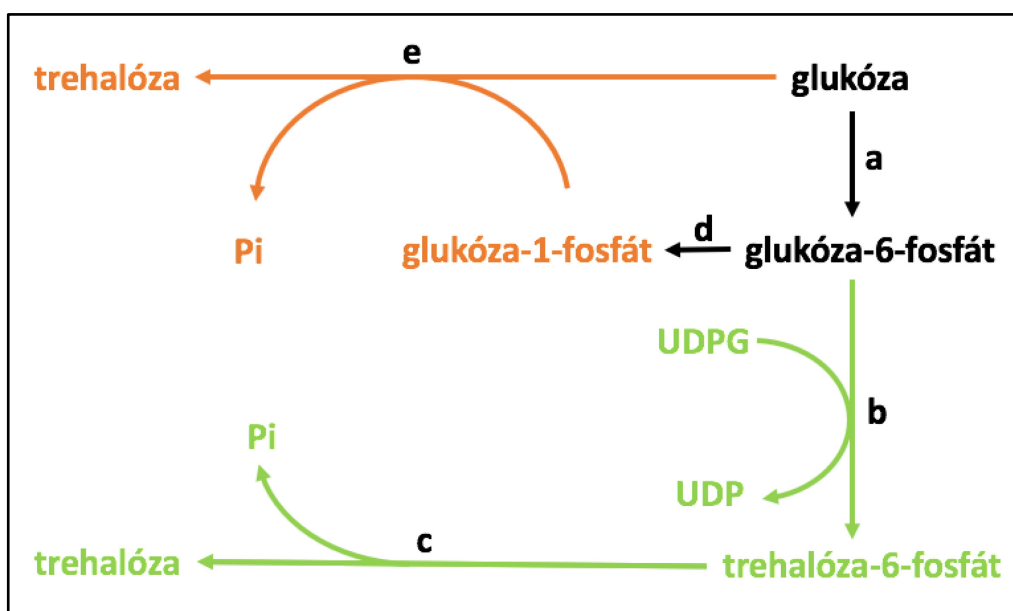
2.2. Trehalóza a trehalóza-6-fosfát

Trehalóza je neredukující disacharid, skládající se ze dvou glukózových podjednotek spojených glykosidovou vazbou 1-1, systematicky jde tedy o α -D-glukopyranosyl-(1,1)- α -D-glukopyranosid. Vyskytuje se u velkého množství organismů, zcela nepřítomna je pravděpodobně jen u obratlovců (Ishihara *et al.*, 1997). U bezobratlých živočichů, mnoha hub a bakterií jde o klíčovou molekulu energetického metabolismu, představující jak rychlý, tak zásobní zdroj energie. Další dlouho známou úlohou trehalózy je její účast na ochraně buněčných komponent při osmotickém stresu (Crowe *et al.*, 1984; Albertorio *et al.*, 2007). U bezobratlých živočichů, bakterií a hub je schopnost syntetizovat a metabolizovat trehalózu známa velice dlouho a je u nich považována za všudypřítomnou (Koch & Koch, 1925; Candy & Kilby, 1961; Elbein, 1967). Velice odlišný byl vývoj názoru na úlohu trehalózy u rostlin. Trehalóza byla u rostlin poprvé identifikována u některých „resurrection plants“, rostlin schopných přežít dlouhá období sucha v desikovaném, anabiotickém stavu. Jde například o vraneček *Selaginella lepidophylla* (Adams *et al.*, 1990), či dvouděložnou rostlinu *Myrothamnus flabellifolia* (Bianchi *et al.*, 1993). U jiných rostlin nebyla trehalóza dlouho vůbec naměřena, a proto se předpokládalo, že schopnost syntetizovat trehalózu mají jen výše uvedené xerofilní druhy rostlin, u kterých akumulace trehalózy vede ke zvýšení odolnosti k osmotickému stresu (Drennan *et al.*, 1993); osmoprotektivní role trehalózy je ovšem v současnosti zejména u rostlin zpochybňována (Ratnakumar & Tunnacliffe, 2006; Yobi *et al.*, 2012). V roce 1998 a následujících letech byly identifikovány geny pro syntézu trehalózy u mnoha druhů rostlin a schopnost syntetizovat trehalózu je dnes považována za všudypřítomnou i u rostlin (Blázquez *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1998; Avonce *et al.*, 2006; Lunn, 2007). Na rozdíl od schopnosti syntézy je obecná schopnost rostlin trehalózu degradovat známa velmi dlouho (Gussin *et al.*, 1969; Glasziou & Gayler, 1969).

2.2.1. Biosyntéza trehalózy

Drah vedoucích k syntéze trehalózy je mezi organismy celá řada. Velká diverzita těchto drah je přítomná u prokaryotních organismů, u kterých bylo popsáno dohromady pět drah běžných a několik drah vzácných (Elbein, 1968; Qu *et al.*, 2004; Kouril *et al.*, 2008). Pro tuto práci je ovšem relevantní zejména dráha otsA-otsB, která jediná se vyskytuje u rostlin. Zároveň je tato dráha nejběžnější mezi všemi organismy.

Druhou pro tuto práci relevantní drahou je dráha treP, která je přítomna mimo jiné u hub (López *et al.*, 2007; Kerner *et al.*, 2012). Znázornění těchto drah viz obrázek 2.1. V dráze otsA-otsB dochází nejprve k syntéze trehalóza-6-fosfátu katalyzované enzymem trehalóza-6-fosfátsyntázou (TPS) a přes tento intermediát je poté syntetizována trehalóza činností enzymu trehalóza-6-fosfatázy (TPP; Leloir & Cabib, 1953; Cabib & Leloir, 1958). Degradace trehalózy je u rostlin katalyzována pravděpodobně jediným enzymem, trehalázou. Tomuto enzymu je věnována kapitola 1.4.



Obrázek 2.2. Biosyntéza trehalózy u rostlin (zeleně) a u hub (oranžově a zeleně) Zeleně je vyznačena dráha otsA-otsB, oranžově pak dráha TreP; a – hexokináza, b – trehalóza-6-fosfátsyntáza, c – trehalóza-6-fosfatáza, d – fosfoglukomutáza, e – trehalóza-6-fosforyláza, Pi – anorganický fosfát, UDP – uridindifosfát, UDPG – UDP-glukóza

2.2.2. Fylogeneze genů biosyntézy a degradace trehalózy

Objev genů pro biosyntézu trehalózy u rostlin byl ve své době velice překvapivý. Ještě překvapivější bylo ovšem zjištění, že geny pro TPS a TPP tvoří relativně velké genové rodiny a tyto geny jsou navíc pod silnou negativní selekcí (Vogel *et al.*, 1998; Leyman *et al.*, 2001; Avonce *et al.*, 2006). Geny pro biosyntézu trehalózy jsou u rostlin pravděpodobně velmi staré, patrně byly přítomny už u předka streptofytní a chlorofytní linie (Lunn, 2007). U předka jednoděložných a dvouděložných rostlin bylo přítom nejméně 6 genů pro TPS, což ukazuje na velice dávné duplikace těchto genů (Yang *et al.*, 2012). Geny pro TPS a TPP

jsou přitom v silném koevolučním vztahu, což ukazuje na provázanost funkcí jimi kódovaných proteinů (Avonce *et al.*, 2006). V rámci některých genů pro TPS jsou přitom přítomny sekvence kódující TPP katalytickou doménu, ačkoliv tato patrně v proteinu není aktivní (Yang *et al.*, 2012). Rostlinné TPP jsou přitom velmi podobné bakteriálním a předpokládá se, že pohlcení α -proteobakterie patrně vedlo k získání prokaryotní TPP, což vedlo ke ztrátě TPP katalytické aktivity u eukaryotického TPS proteinu (Lunn, 2007). Na druhé straně některé geny pro TPP obsahují sekvence TPS katalytických domén, ačkoliv patrně TPP proteiny nemají odpovídající katalytickou aktivitu (Vogel *et al.*, 1998; Leyman *et al.*, 2001). V rámci sekvencí genů kódujících TPS a TPP jsou silně konzervovány katalytické domény (Avonce *et al.*, 2006); navzdory tomu pravděpodobně ne všechny TPS a TPP proteiny mají katalytickou aktivitu. U TPS se, alespoň u huseníčku *A. thaliana*, dlouho předpokládalo, že aktivitu vykazuje pouze TPS1 (Blázquez *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1998). V nedávné době se ukázalo, že katalyticky aktivní jsou i proteiny TPS2 a TPS4 (Delorge *et al.*, 2015). Dále je také známo, že katalyticky aktivní jsou u *A. thaliana* i proteiny TPS6 (Chary *et al.*, 2007) a TPS11 (Singh *et al.*, 2011). Z TPP proteinů mají u huseníčku *A. thaliana* TPP katalytickou aktivitu patrně všechny proteiny (Vandesteene *et al.*, 2012).

Geny pro TPS i TPP jsou u většiny rostlin diverzifikovány do dvou tříd, lišících se zejména počtem a velikostí intronů (Lunn, 2007). Například u huseníčku *A. thaliana* patří do TPS třídy I čtyři geny a do třídy II 7 genů; do TPP třídy A patří 3 geny a do třídy B 7 genů (Lunn, 2007; Han *et al.*, 2016). Jde celkově vzato o velmi dynamické genové rodiny, u kterých v průběhu evoluce docházelo například ke genovým fúzím, genovým konverzím, segmentálním duplikacím a je pravděpodobné, že tyto rodiny stále procházejí radiací (Avonce *et al.*, 2006). Oproti tomu o trehaláze bývá kanonicky opakováno, že je kódována jen jedním genem, a to i například v práci věnující se výhradně trehaláze (Frison *et al.*, 2007). Z fylogenetických analýz bývá také často vynechávána (Mu *et al.*, 2016). Navzdory tomu bylo popsáno, že u topolu *Populus trichocarpa* a čepenky *Physcomitrella patens* jsou přítomny tři paralogy trehalázového genu (Lunn, 2007); u manioku *Manihot esculenta* byly popsány dva paralogy trehalázového genu (Han *et al.*, 2016). Trehalázové geny pravděpodobně mají eukaryotický původ, podobně jako TPS a na rozdíl od TPP (Lunn, 2007).

2.2.3. Úloha trehalózy v obraně proti abiotickému stresu

Mnohokrát navrženou, avšak poměrně diskutabilní úlohou trehalózy u rostlin je její možná účast v protekci membrán a proteinů při osmotickém stresu. Tato úloha trehalózy byla několikrát popsána *in-vitro*. Je však otázkou, do jaké míry je významná *in vivo*. (viz níže). Vlastností, která dává trehalóze potenciál chránit buněčné komponenty při osmotickém stresu, je její speciální struktura daná vazbou s konfigurací α, α -1,1. Dvě její glukózové podjednotky formují zjednodušeně řečeno tvar písmene U, což umožňuje trehalóze vytvářet hydratační obal okolo proteinů a fosfolipidů (Crowe *et al.*, 1984; Albertorio *et al.*, 2007; da Costa Morato Nery *et al.*, 2008). Tato úloha je pravděpodobně stěžejní zejména u prokaryotních organismů a hub (Strøm & Kaasen, 1993; Ocón *et al.*, 2007; da Costa Morato Nery *et al.*, 2008).

Ačkoliv právě u některých hub a také u vířníků byla tato úloha trehalózy do značné míry zpochybněna (Tunnacliffe & Lapinski, 2003; Ratnakumar & Tunnacliffe, 2006).

Hlavním důvodem, proč trehalóza bývá coby osmoprotektant zpochybňována je, že se vyskytuje v příliš nízkých množstvích a ve vysokých množstvích by narušovala sacharidovou signalizaci (viz dále). U některých xerofilních rostlin se však trehalóza akumuluje při desikaci, což bývá spojováno s osmoprotektivní úlohou trehalózy (Drennan *et al.*, 1993; Paul *et al.*, 2008). V současnosti ale není ani tento názor příliš uznáván. Například u vranečku *S. lepidophylla* bylo prokázáno, že akumulace trehalózy nezprostředkovává u této rostliny odolnost k osmotickému stresu, tuto úlohu zde patrně zastává manitol (Yobi *et al.*, 2012, 2013). Akumulace trehalózy při vysychání byla zaznamenána ještě u jedné „resurrection plant“, *Tripogon loliiformis* (čeleď Poaceae). Zde trehalóza i v neinduktivních podmínkách stimuluje tvorbu autofagozómů (které jsou po období anhydrobiózy metabolizovány), což ve výsledku zabraňuje odumírání buněk (Williams *et al.*, 2015). V jiných pracích zabývajících se úlohou trehalózy v obraně proti abiotickému stresu vůbec nebyla sledována struktura buněk, a je tak možné, že podobnou úlohu má trehalóza i u jiných poikilohydrických rostlin (Williams *et al.*, 2015). Spíše zajímavostí je, že propojení trehalózového metabolismu s odumíráním buněk bylo popsáno i u vodního korýše žábřonožky *Arthemio parthenogenetica*, kde změny v regulaci trehalózy vedou k apoptóze a trehalóza je zde klíčovým regulátorem tvorby cyst v nepříznivých obdobích (Yang *et al.*, 2013). Nabízí se tedy obecná úloha trehalózy v regulaci buněčné smrti společná rostlinám i živočichům. K akumulaci trehalózy dochází při stresu suchem i u dalších druhů rostlin, jako je kapara *Capparis ovata* (Ilhan *et al.*, 2015), nebo maniok *Manihot esculenta* (Han *et al.*, 2016). Právě u těchto druhů autoři zastávají názor, že trehalóza skutečně přispívá k ochraně buněčných komponent. Zcela nesporné ovšem je, že akumulace trehalózy provází celou řadou dalších forem abiotického stresu. Například u huseničky *A. thaliana* dochází k akumulaci trehalózy jak při suboptimálních, tak supraoptimálních teplotách (Kaplan *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2013). Trehalóza se může akumulovat i u rostlin vystavených stresu zasolením (El-Bashiti *et al.*, 2005). Spíše zajímavostí je, že trehalóza přidaná do vody „řezaným“ rostlinám vede k výraznému oddálení jejich senescence (Otsubo & Iwaya-Inoue, 2000; Iwaya-Inoue & Takata, 2001). V minulosti byla také provedena řada genetických manipulací rostlin cílených k zvýšení obsahu trehalózy a tím i odolnosti k abiotickému stresu, kdy tyto byly poměrně úspěšné (např. Jang *et al.*, 2003; Karim *et al.*, 2007). Úloha trehalózy v obraně proti abiotickému stresu tak zůstává do značné míry neobjasněná, ačkoliv se jí nesporně účastní. Jedno z možných vysvětlení je, že trehalóza funguje jako obecný signál stresu, a to abiotického i biotického, čemuž odpovídá i transkripční odpověď huseničky *A. thaliana* na ošetření trehalózou (Bae *et al.*, 2005).

2.2.4. Úloha trehalóza-6-fosfátu a trehalózy v signalizaci

U většiny organismů je trehalózový metabolismus především součástí energetického metabolismu, u rostlin má však trehalózový metabolismus úlohu zejména v sacharidové signalizaci. Intermediátem biosyntézy trehalózy v otsA-otsB dráze je trehalóza-6-fosfát. Právě tato molekula je s největší pravděpodobností hlavní

signální molekulou trehalózové signalizace, ačkoliv trehalóza pravděpodobně také funguje jako signální molekula (Lunn *et al.*, 2014; Figueroa & Lunn, 2016). Trehalózový signál je nejspíše do značné míry zprostředkován přes T6P a signál samotné trehalózy je tímto možná do určité míry maskován.

O významu trehalózy a T6P u rostlin vypovídají například pozorování získaná na rostlinách s nefunkčními geny pro otsA-otsB dráhu. Mutace v genu *AtTPS1* vede u huseníčku *A. thaliana* k zastavení vývoje embrya na začátku torpédovité fáze a syntéza T6P a trehalózy tak bývá u rostlin považována za esenciální (Eastmond *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2006). Je ovšem možné, že nikoliv syntéza T6P a trehalózy katalyzovaná proteinem TPS1, ale samotný protein TPS1 je pro vývoj embrya esenciální (Figueroa & Lunn, 2016). Protein TPS1 má totiž alespoň u huseníčku několik izozymů, TPS2 a TPS4 (Delorge *et al.*, 2015), které jsou v embryu také exprimované (Le *et al.*, 2010) a měly by tak nepřítomnost TPS1 kompenzovat. Úloha TPS1 tak může být jiná, než katalytická; je například známo, že tento protein tvoří komplex s několika klíčovými proteiny regulujícími buněčný cyklus, jako je cyklin-dependentní kináza A (CDKA), kinesin s ní interagující (KCA1) a β -tubulin, a klíčová úloha TPS1 v embryogenezi tak může souviset právě s buněčným cyklem (Geelen *et al.*, 2007; Figueroa & Lunn, 2016). Embrya mutantních rostlin se ale vyvíjela standardně po vnesení TPS1 z bakterie *Escherichia coli*, což ukazuje spíše na úlohu trehalózy, či T6P. Stejný účinek ovšem neměla exogenní dodávka trehalózy, takže jde nejspíše o úlohu T6P, která je zde kritická (Schluepmann *et al.*, 2003).

Trehalóza-6-fosfát se účastní regulace velké řady buněčných procesů a popis všech úloh T6P v rostlině by byl rozsahem nad rámec této práce. Proto se zde omezím spíše na výčet těchto úloh, pro bližší pohled doporučuji některé přehledové články: Paul *et al.*, 2008; Lunn *et al.*, 2014; Figueroa & Lunn, 2016. Výše bylo zmíněno, že T6P je možná nutný pro vývoj embrya. Nejzásadnější úlohou T6P je pravděpodobně jeho schopnost reflektovat hladinu sacharózy v buňce a kontrolovat tak energetickou bilanci buňky (Martins *et al.*, 2013; Yadav *et al.*, 2014). T6P v závislosti na hladině sacharózy vyvolává patřičné buněčné odpovědi, a to způsobem časově a pletivově specifickým (Figueroa & Lunn, 2016). Zvýšení obsahu sacharózy vede k zvýšení obsahu T6P a zvýšený obsah T6P tak reflektuje pozitivní energetickou bilanci (Yadav *et al.*, 2014) a T6P signál tak ovlivňuje zejména uhlíkový metabolismus (Figueroa *et al.*, 2016). Umělé zvýšení obsahu T6P vede u rostlin k nasměrování metabolismu k syntéze organických kyselin a aminokyselin (Shane *et al.*, 2016; Figueroa *et al.*, 2016) a také k syntéze škrobu (Kolbe *et al.*, 2005; Lunn *et al.*, 2006). Celkově vzato tak tedy T6P stimuluje anabolismus při pozitivní energetické bilanci. S tím se pravděpodobně váže regulace celé řady dalších procesů kontrolovaných trehalóza-6-fosfátem. Jde například o syntézu komponent buněčné stěny (Gómez *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2010), fotosyntetickou aktivitu (Pellny *et al.*, 2004), květní indukci (van Dijken *et al.*, 2004) nebo cirkadiánní rytmicitu (Martins *et al.*, 2013). Zajímavá je také úloha proteinu TPS6 u *A. thaliana*. Změny v expresi tohoto katalyticky aktivního proteinu vedly u rostlin huseníčku k zásadním změnám ve tvaru epidermálních buněk, trichomů a struktuře listů i stonku, což ukazuje na možné propojení T6P a trehalózy například s cytoskeletem (Chary *et al.*, 2007). Signalizační úloha trehalózy je do značné míry neznámá. Je také možné, že velká část účinků trehalózy je zprostředkována přes

ovlivnění hladiny T6P. Jak bylo uvedeno výše, je známo, že se trehalóza akumuluje v rostlinách při různých typech stresu. Přesto je množství trehalózy nejspíše nedostačující k přímému protektivnímu účinku a souvisí pravděpodobně spíše se signalizací spojenou se stresem (Fernandez *et al.*, 2010). Obsah trehalózy je skrze regulaci míry genové exprese trehalázy pod kontrolou kyseliny abscisové (viz kapitola 2.3. věnovaná trehaláze), což také nasvědčuje propojení trehalózy se stresovou odpovědí. V listech ječmene *Hordeum vulgare* bylo v důsledku jejich vystavení exogenní trehalóze pozorováno zvýšení aktivity klíčových enzymů biosyntézy fruktanů, sacharóza:sacharóza-1-fruktosyltransferázy (Wagner *et al.*, 1986) a sacharóza:fruktan-6-fruktosyltransferázy, u kterého byla pozorována i zvýšená abundance mRNA těchto genů (Müller *et al.*, 2000). Dohromady se tedy zdá, že trehalóza má potenciál účastnit se podobně jako T6P regulace syntézy zásobních polysacharidů ve zdrojových pletivech. Trehalóza má ovšem podobně jako T6P také potenciál stimulovat degradaci sacharózy v sinkových pletivech; bylo pozorováno, že dodání exogenní trehalózy do živného roztoku kořenům sóji *Glycine max* vedlo k výraznému zvýšení aktivity sacharózasyntázy (ve směru degradace sacharózy) a invertázy (Müller *et al.*, 1998). V tomto konkrétním případě je také nutné uvažovat kontext symbiózy s hlízovými bakteriemi a mykorhizními houbami. Trehalóza by mohla na fyzickém rozhraní mezi symbionty fungovat jako signál přítomnosti symbionta a stimulovat tvorbu hexóz, které poté získá symbiont (Wiemken, 2007). Takový signál může být značně manipulativní, způsobuje totiž změny v energetickém metabolismu a je patrné, že může být houbovým symbiontem „zneužit“. Zvýšení aktivity invertáz po ošetření trehalózou bylo pozorováno i u kokotice *Cuscuta reflexa* (Veluthambi *et al.*, 1982b). Možná právě z důvodu manipulačního potenciálu trehalózy má exogenní trehalóza u rostlin potenciál fungovat jako elicitor. U pšenice *Triticum aestivum* bylo ošetření prýtu 1,5% roztokem trehalózy pozorováno zvýšení produkce peroxidu vodíku (Renard-Merlier *et al.*, 2007) a zvýšení aktivity řady enzymů obrany proti biotickému stresu, jako fenylalaninamoniaklyázy a peroxidázy (Reignault *et al.*, 2002). U těchto rostlin poté byla zvýšena odolnost vůči infekci fytopatogenní houbou *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* až na 95 %, trehalóza tedy zajistila priming rostlin a jejich následnou vyšší odolnost (Reignault *et al.*, 2002; Renard-Merlier *et al.*, 2007). S tím může do značné míry souviset i několikrát pozorované zvýšení aktivity trehalázy vyvolané infekcí některými fytopatogeny, které bude popsáno v následující kapitole, věnující se trehaláze. Trehalózu ale do rostlinných pletiv nevylučují jen fytopatogenní organismy, patrně ji mohou vylučovat i mykorhizní houby (Deveau *et al.*, 2010), což podporuje hypotézu manipulace hostitelské rostliny přes sekreci trehalózy (Brodmann *et al.*, 2002; Lunn, 2007; Wiemken, 2007). Trehalózu také vylučují ve svých slinách mšice *Myzus persicae* a paradoxně napadení těmito mšicemi vede k obranné systemické akumulaci trehalózy v rostlině (Hodge *et al.*, 2013). To může souviset s pozorovanou indukcí transkripce genů spojených s methyljasmonátovou a ethylenovou drahou po ošetření rostlin trehalózou (Bae *et al.*, 2005). Podobná reakce byla zaznamenána také u citronovníku *Citrus* spp. napadeného bakterií *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; zde bakterie používá trehalózu v patogenezi a zároveň ji používá rostlina v obranné odpovědi na napadení bakterií (Piazza *et al.*, 2015).

Velice důležitou otázkou ohledně metabolismu trehalózy je transport trehalózy a T6P. O transportu těchto molekul přes plasmalemu není ovšem u rostlin nic známo (Lunn *et al.*, 2014). Je však patrné, že minimálně trehalóza může být transportována xylémem či floémem, jelikož byl pozorován její poměrně rychlý přesun v rámci rostliny z živného roztoku u sóji *G. max*, s čímž se váže i nutný transport přes plasmalemu v oblasti endodermis (Müller *et al.*, 1995b). Pozorování u orchideje *Bletilla hyacinthina* (Smith & Smith, 1973) naznačuje, že možná dochází k transportu trehalózy spřažením s transportem vodíkových protonů, u listů těchto rostlin totiž narušil transport trehalózy ionofor rozpřahující protonový gradient, CCCP (cyanide m-chlorophenyl hydrazine). Rychlost příjmu trehalózy byla u těchto listů rovna asi pětině rychlosti příjmu glukózy (Smith & Smith, 1973). Poměrně pomalý příjem trehalózy byl zaznamenán také u kořenů buku *Fagus sylvatica* (Lewis & Harley, 1965a).

2.2.5. Utilizace trehalózy rostlinami

První zaznamenaný pokus o kultivaci rostlin na trehalóze jakožto výhradním zdroji uhlíku a energie byl proveden u orchidejí (čeleď Orchidaceae). Konkrétně u protokormů druhu *Phalaenopsis* cv. Doris z podčeledi Epidendroideae, kde se trehalóza ukázala být v tomto ohledu vhodná a srovnatelná například se sacharózou (Ernst *et al.*, 1971).

Tomu, že jsou orchideje schopny trehalózu utilizovat napovídala už dřívější práce provedená na prstnatci *Dactylorhiza purpurella* (podčeleď Orchidoideae) a mykorrhizní houbě *Rhizoctonia repens*. Zde byl v mykorrhizních protokormech po dodání značené [¹⁴C]glukózy pozorován přesun značeného uhlíku nejprve do trehalózy, následovaný sníženým značením trehalózy vystřídáním silným značením sacharózy, což ukazuje na možný přesun trehalózy z houbového symbionta do orchideje (Smith, 1967). Robert Ernst a kolektiv se k této práci překvapivě neodkazují; myšlenku přesunu houbových metabolitů jako je trehalóza do orchideje ale následně Sarrah Smithová rozvinula v další práci provedené na stejném druhu, *D. purpurella* a na druhu *Bletilla hyacinthina* (podčeleď Epidendroideae). Zde se trehalóza opět ukázala být velmi vhodným zdrojem uhlíku a energie pro protokormy obou testovaných druhů (Smith, 1973). *B. hyacinthina* je do určité míry schopna přijímat trehalózu také skrze listové řezy; utilizace trehalózy tedy není patrně u orchidejí spojena jen s pletivý, která jsou v kontaktu s mykorrhizní houbou (Smith & Smith, 1973). V dalších letech bylo u řady dalších druhů orchidejí ukázáno, že jsou schopny trehalózu snadno utilizovat. Například u smrkovníku *Goodyera repens* (podčeleď Orchidoideae), kde klíčení, růst protokormů i vývin rostlinek byly srovnatelné s kulturami podporovanými sacharózou a fruktózou (Purves & Hadley, 1976). Trehalóza je vhodným zdrojem uhlíku i pro embryogenní kalusy orchidejí, u kterých pozitivně stimuluje tvorbu tzv. protocorm-like bodies (PLB, útvarů podobných protokormů) a jejich vývoj v dospělé rostlinky (Jheng *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Sopalan *et al.*, 2010). Jen málo je ovšem známo o vlivu trehalózy na metabolismus orchidejí, uvedené práce se zpravidla zabývají především klíčivostí semen, velikostí protokormů a rostlin a regenerací PLB.

U jiných rostlin, než u orchidejí je trehalóza obecně považována za velmi nevhodný, ba nepoužitelný zdroj energie, a to zejména z toho důvodu, že silně vychyluje jemně balancovaný systém sacharidové signalizace. Tato pozorování pochází především ze studií na huseníčku *A. thaliana* (viz výše). Existují však pozorování dosvědčující do jisté míry, že utilizace trehalózy nejsou schopny pouze orchideje. Kromě výše popsaných kultivačních pokusů na orchidejích, byla první prací zabývající se utilizací trehalózy u rostlin studie zabývající se utilizací trehalózy u buněčných suspenzí a orgánových kultur několika druhů rostlin a její výsledky jsou tak do určité míry arteficiální. V této práci bylo popsáno, že buněčné kultury celé řady druhů rostlin jsou schopny trehalózu využívat srovnatelně se sacharózou (Veluthambi *et al.*, 1981). Šlo o kultury tabáku *Nicotiana tabacum*, durmanu *Datura innoxia* (oba druhy patří do čeledi Solanaceae) a mrkve *Daucus carota* (čeleď Apiaceae). Dále trehalózu využívaly i rostlinky okřehku *Lemna paucicostata* (čeleď Araceae) pěstované ve tmě a orgánové kultury (odvozené z prýtlů) druhů kukuřice *Zea mays* (čeleď Poaceae), ředkve *Raphanus sativus* (čeleď Brassicaceae), povijnice *Ipomoea quamoclit* (čeleď Convolvulaceae) a fazolu *Phaseolus radiatus* (čeleď Fabaceae), což ukazuje na možnou obecnou schopnost rostlin trehalózu využívat (Veluthambi *et al.*, 1981). U jednoho zařazeného druhu, parazitické kokotice *Cuscuta reflexa* (čeleď Convolvulaceae) byl ovšem opakovaně sledován velice drastický fenotyp po ošetření trehalózou, zahrnující zejména rozsáhlé nekrózy vzrostných vrcholů, což autoři dávají do kontextu s nízkou trehalázovou aktivitou této rostliny (Veluthambi *et al.*, 1981, 1982b,c). Je zarážející, že z těchto prací bývá citována pouze informace o toxickém efektu trehalózy na rostliny (např. Paul *et al.*, 2008; O'Hara *et al.*, 2013), či bývá citována naprosto chybně, např. že exogenní trehalóza může rostlině signalizovat, že byla napadena kokotici (Lunn *et al.*, 2014). Tato pozorování ale vypovídají zejména o tom, že akumulace trehalózy v důsledku její pomalé degradace může být u rostlin toxická (Veluthambi *et al.*, 1981). Nikoliv, že exogenní dodávka trehalózy rostlině je nutně toxická. Dokonce ani akumulace trehalózy však nemusí být pro rostlinu vždy toxická. U sóji *G. max* bylo popsáno, že inhibice degradace trehalózy vede v rostlinách k výrazné akumulaci trehalózy, nedoprovázené změnami fenotypu, ovšem doprovázené poměrně velkými změnami v obsahu endogenních sacharidů (Müller *et al.*, 1995b). Podobně u tabáku *N. tabacum* akumulujícího trehalózu v důsledku inhibice trehalázy došlo sice k výrazným změnám v obsahu endogenních sacharidů, rostliny ovšem byly vitální (Best *et al.*, 2011). Podobně u pšenice *Triticum aestivum* byl při stresu suchem zvýšen obsah trehalózy až 62krát oproti normálnímu stavu a rostliny vykazovaly standardní fenotyp (El-Bashiti *et al.*, 2005). Rostlinou, pro kterou jsou ovšem vysoké koncentrace trehalózy nesporně velmi škodlivé, je huseníček *A. thaliana* (Wingler *et al.*, 2000; Schluepmann *et al.*, 2004; Ramon *et al.*, 2007). U huseníčku vede exogenní dodání trehalózy do živného média k celé řadě výrazných fenotypových změn, zejména výraznému zpomalení růstu, zkrácení kořenů a tvorbě bulek na kořenech, kopinatosti listů a výrazným změnám ve struktuře květenství (Wingler *et al.*, 2000; Schluepmann *et al.*, 2004; Delatte *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2013). Výrazně se u takto pěstovaných rostlin huseníčku mění zastoupení a obsah sacharidů, zejména se akumuluje škrob a snižuje obsah sacharózy v kořenech (Wingler *et al.*, 2000; Delatte *et al.*, 2011). U výše zmíněné studie na tabáku *N. tabacum* bylo ukázáno, že rostliny

podporované exogenní trehalózou mají velice podobné změny těm pozorovaným u huseníčku (Best *et al.*, 2011). U kokotice *C. reflexa* bylo po vystavení exogenní trehalóze pozorováno snížení obsahu všech měřených sacharidů, včetně škrobu, což mohlo být dáno tím, že zde trehalóza byla již v množství silně toxickém (Veluthambi *et al.*, 1982b). Exogenní dodání trehalózy také může způsobovat výrazné změny ve struktuře buněčné stěny a syntéze jejích komponent (Veluthambi *et al.*, 1982c; Best *et al.*, 2011). Řada projevů způsobených exogenním dodáním trehalózy je alespoň u huseníčku *A. thaliana* patrně zprostředkována trehalóza-6-fosfátem (Schluepmann *et al.*, 2004), ačkoliv ne nutně všechny a kompletně. Různá míra schopnosti různých rostlin tolerovat či využít exogenní trehalózu je s největší pravděpodobností dána vlastnostmi a distribucí enzymu trehalázy, který pravděpodobně jako jediný enzym u rostlin katalyzuje degradaci trehalózy. O tomto enzymu pojednává následující kapitola.

2.3. Trehaláza

Trehaláza je enzym, který katalyzuje degradaci disacharidu trehalózy na dvě glukózové molekuly. U rostlin jde s největší pravděpodobností o jediný enzym, který tuto reakci katalyzuje. Trehaláza byla objevena, alespoň pokud je mi známo, u všech doposud studovaných organismů. Druhým známým enzymem, jehož aktivita vede k degradaci trehalózy je trehalózafosforyláza, která je přítomna například u některých řas (Belocopitow & Maréchal, 1970), u některých hub, jako je pečárka *Agaricus bisporus* (Wannet *et al.*, 1998), muchomůrka *Amanita muscaria* (López *et al.*, 2007), nebo *Cenococcum geophilum* (Kerner *et al.*, 2012), a také u některých bakterií (Kizawa *et al.*, 1995). Ačkoliv se tato dráha nevyskytuje u rostlin, vyskytuje se u hub účastnících se OrM, a proto je i pro tuto práci do jisté míry relevantní. Je totiž známo, že právě uvedená *A. muscaria* se účastní OrM a podobně i některé houby z řádu Agaricales (McCormick *et al.*, 2004). Není ani vyloučeno, že tento enzym sehraje roli v interakci bakterií, orchidejí a mykorrhizních hub. O těchto interakcích ale existuje jen velice málo poznatků (Wilkinson *et al.*, 1989; Tsavkelova *et al.*, 2007). Trehalóza pravděpodobně může být štěpena i volnými radikály (Kendall *et al.*, 1990).

Jelikož se tato práce zabývá primárně rostlinami a trehalázou, zaměřím se však dále zejména na trehalázu.

2.3.1. Struktura a vlastnosti trehalázy

Trehaláza, jak již bylo uvedeno, je enzym zastoupený nejspíše u všech organismů. Zcela zásadní roli hraje například u bezobratlých, kde je trehalóza jedním z hlavních sacharidů v hemolymfě a její degradace trehalázou je pro bezobratlé nezbytná (Candy & Kilby, 1961; Silva *et al.*, 2006). Ačkoliv obratlovci pravděpodobně v evoluci ztratili schopnost syntetizovat trehalózu, je u nich přítomna trehaláza, související pravděpodobně zejména s užitím trehalózy exogenní, která je součástí jejich potravy. U člověka se například trehaláza vyskytuje zejména v tenkém střevě, játrech a také ledvinách (Ishihara *et al.*, 1997). Dále je trehaláza klíčovým enzymem v metabolismu bakterií, které mají více homologů tohoto enzymu

a kde je trehalóza důležitým energetickým metabolitem (Horlacher *et al.*, 1996). Více trehaláz mají také houby, kde houbové trehalázy se liší pH optimem, např. kvasinka *Sacharomyces cerevisiae* má tři různé trehalázy, jednu kyselou vakuolární a dvě neutrální cytoplazmatické (Kopecka *et al.*, 2014).

U rostlin je bohužel známo poměrně málo o struktuře a vlastnostech trehalázy, zejména chybí informace o lokalizaci trehaláz v rámci rostlinné buňky, posttranslačních modifikacích a konzervovaných doménách. Je poměrně dobře známo, že rostlinné trehalázy se mezi druhy velice liší svou aktivitou. Pravděpodobně první prací zabývající se trehalázovou aktivitou byla práce K. Veluthambiho a kolektivu (1981). Zde byla měřena aktivita u orgánových kultur rostlin z čeledi Poaceae (*Zea mays*; 5,1 nmol glukózy.min⁻¹.mg⁻¹ proteinu), Brassicaceae (*Raphanus sativus*; 10,7), Convolvulaceae (*Ipomoea quamoclit*; 23,4; a *Cuscuta reflexa*; 0,3) a čeledi Fabaceae (*Phaseolus vulgaris*; 0,8). Vyjma druhu *C. reflexa* došlo u všech těchto druhů k výraznému (až 9násobnému) zvýšení trehalázové aktivity po aplikaci trehalózy (Veluthambi *et al.*, 1981). Další důležitou prací v této oblasti byla práce E. Kendalla a kolektivu (1990) na buněčných suspenzích, kde je ovšem nutné přihlídnout k značné arteficiálnosti takto naměřených hodnot, způsobené zejména vysokým obsahem auxinu v těchto kulturách, kdy tento může stimulovat trehalázovou aktivitu (Müller *et al.*, 1995a). Zde byla nejvyšší trehalázová aktivita naměřena u vranečku *Selaginella lepidophylla* (133 µg.min⁻¹.g⁻¹ čerstvé hmotnosti), který je znám vysokým obsahem trehalózy (Adams *et al.*, 1990). Vysoká trehalázová aktivita byla naměřena u pšenice *Triticum aestivum* (73-99 µg.min⁻¹.g⁻¹ čerstvé hmotnosti) a borovice *Pinus banksiana* (44 µg.min⁻¹.g⁻¹ čerstvé hmotnosti) a naopak u příbuzných druhů ječmene *Hordeum vulgare* a smrku *Picea mariana* nebyla naměřena žádná trehalázová aktivita (Kendall *et al.*, 1990). Zajímavé je, že také nebyla naměřena trehalázová aktivita u sóji *Glycine max*, u které jinými autory byla naměřena poměrně vysoká aktivita (Müller *et al.*, 1992). Dále byla měřena aktivita trehalázy například u jetele *Medicago sativa*, kde dosahovala nejvyšší aktivity ve stonku (0,15 µg.min⁻¹.mg⁻¹ proteinu) a v kořenech 0,12 µg.min⁻¹.mg⁻¹ proteinu (Wolska-Mitaszko *et al.*, 2005).

Rostlinné trehalázy se také velice liší Km (konstantou Michaelise-Mentenové), pH optimem, velikostí monomeru proteinu a kvartérní strukturou. Parametry trehalázy pro některé druhy jsou uvedeny v tabulce 1.1.

Studie	druh	Km [mM trehalózy]	pH optimum	velikost [kDa]	kvarterní struktura
(Müller <i>et al.</i> , 1992)	<i>Glycine max</i>	0,28	3,7	54	monomer
(Kord <i>et al.</i> , 2012)	<i>Triticum aestivum</i>	2	5-6,5	63	trimer
(Kord <i>et al.</i> , 2013)	<i>Cicer arietinum</i>	3,64	5,5	38	hexamer
(García <i>et al.</i> , 2005)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	0,109	3,9	42	monomer

(Li <i>et al.</i> , 2008)	<i>Actinidia deliciosa</i>	0,25	5-6	36	-
(Glasziou & Gayler, 1969)	<i>Saccharum officinarum</i>	0,1	6,2	-	-
(Gibson <i>et al.</i> , 2007)	<i>Escherichia coli</i> TreA	0,41	5,5	-	-
(Horlacher <i>et al.</i> , 1996)	<i>Escherichia coli</i> TreF	1,9	6	63	monomer

Tabulka 1.1. Vlastnosti a struktura trehaláz různých druhů.

Trehalázy různých druhů se také do značné míry liší svou substrátovou specificitou. Například trehaláza pšenice je vysoce specifická a téměř nedegraduje jiné sacharidy než trehalózu (Kord *et al.*, 2012). Trehaláza cizrny naopak degraduje celou řadu dalších sacharidů, do značné míry například sacharózu, celobiózu, laktózu, nebo maltózu (Kord *et al.*, 2013). Trehaláza fazolu neštěpí laktózu, ale jinak všechny disacharidy, co trehaláza cizrny a navíc ještě melibiózu a rafinózu (García *et al.*, 2005). Trehalázy rostlin jsou také odlišné co do aktivace a inhibice ionty různých kovů, například trehaláza cizrny je aktivována Mn^{2+} , Ni^{2+} a Co^{2+} , naopak inhibována Na^+ , K^+ a Zn^{2+} (Kord *et al.*, 2013), trehaláza fazolu je inhibována Na^+ a K^+ . Některé trehalázy pravděpodobně fungují jako metaloprotein (Kord *et al.*, 2012, 2013), jiné naopak nikoliv (Müller *et al.*, 1992; Li *et al.*, 2008). Zdá se, že většina trehaláz prochází glykosilací (Müller *et al.*, 1992; Frison *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008).

2.3.1.1. Inhibitory trehalázy

Velice důležitou vlastností trehaláz je, že jsou pravděpodobně všechny citlivé k inhibitoru validamycinu A (Asano *et al.*, 1987) s inhibičními konstantami v řádu jednotek nM (Müller *et al.*, 1992; Kord *et al.*, 2012), kdy Validamycin A je velice častým experimentálním nástrojem studia trehalázy: je velice specifický k trehaláze a je dobře transportován v rámci celého kormusu rostliny, ač není známo, jakým způsobem (Asano *et al.*, 1987; Müller *et al.*, 1995a). Validamycin funguje jako kompetitivní inhibitor, mimikující trehalózu (jde o tzv. pseudooligosacharid). Jedná se o glykosid, jehož aglykonem je validoxylamin A, který samotný je ještě účinnějším inhibitorem trehalázy, ovšem validamycin A se mnohem lépe transportuje do buněk (Asano *et al.*, 1987). Jako určitý nedostatek použití validamycinu A je tedy jeho možná různá účinnost v závislosti na přítomnosti a aktivitě patřičné β -glukosidázy v daném pletivu. Kromě validamycinu A je známa celá řada dalších inhibitorů, např. 1-thiatrehazolin (Gibson *et al.*, 2007), nebo další validamyciny (Asano *et al.*, 1987). Validamyciny ovšem nejsou jedinými glykosidy inhibujícími trehalázu. Jak bylo uvedeno výše, trehaláza je esenciální pro životaschopnost bezobratlých živočichů. Inhibitory trehalázy jsou tedy pro bezobratlé velice toxické a bylo opakovaně pozorováno, že právě inhibice trehalázy je jedním z obranných mechanismů rostlin proti bezobratlým parazitům. Některé glykosidy produkované rostlinami, obsažené

například v latexu, fungují jako silné inhibitory trehalázy hmyzu (Silva *et al.*, 2006; Tatun *et al.*, 2014). Trehalázy některých rostlin jsou také inhibovány manitolem, glukózou a glukosaminem (Li *et al.*, 2008; Kord *et al.*, 2012). Validamycin inhibuje též enzym trehalázafosforylázu (Kizawa *et al.*, 1995), která je inhibována také D-glukalem a do určité míry i trehalózou a glukóza-1-fosfátem (Eis *et al.*, 2001).

2.3.1.2. Regulace katalytické aktivity trehalázy

Velice důležitou otázkou je u každého enzymu regulace jeho aktivity. Za současného stavu poznání nelze jednoznačně říci, která z úrovní regulace aktivity je jakým způsobem u trehalázy významná. Existují doklady o regulaci aktivity trehalázy na úrovni transkripce genu (Garapati *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016). O regulaci skrze stabilitu transkriptů a translaci není v současnosti známo téměř nic. Trehalázová aktivita pravděpodobně není příliš stimulována svým substrátem (Müller *et al.*, 1995a) a jen u aktinidie byla zaznamenána mírná inhibice jejím produktem, glukózou (Li *et al.*, 2008). Důležitou úlohu v regulaci aktivity trehalázy by mohly plnit její posttranslační modifikace proteinu. U rostlin ovšem (kromě glykosylace) existuje jen minimum informací o těchto modifikacích. U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je poměrně dobře znám mechanismus aktivace trehalázy. Proteinkináza A fosforyluje specifické seriny, čímž umožní vazbu specifického 14-3-3 proteinu (Veisova *et al.*, 2012). Pro aktivaci je ovšem nutné ještě zvýšení hladiny Ca^{2+} a následná vazba Ca^{2+} -kalmodulindependentní kinázy (CaMK) na specifický Ca^{2+} -vazebný motiv trehalázy, který interaguje jak s katalytickou doménou trehalázy, tak s 14-3-3 proteinem. Tím dojde k odhalení jinak zanořené katalytické domény a aktivaci trehalázy (Veisova *et al.*, 2012; Macakova *et al.*, 2013). U bakterie *Escherichia coli* pravděpodobně dochází k aktivaci také odhalením katalytické domény, ovšem bez účasti 14-3-3 proteinu a CaMK (Gibson *et al.*, 2007). Rostlinná trehaláza je co do diskrétních sekvenčních motivů poměrně podobná bakteriální (Barraza & Sánchez, 2013). V sekvencích rostlinných trehaláz je kromě katalytické domény vždy přítomen jen jeden další konzervovaný motiv a tím je doména podléhající fosforylaci, s největší pravděpodobností je tak fosforylace klíčovým krokem regulace aktivity trehalázy (Barraza & Sánchez, 2013).

2.3.1.3. Buněčná lokalizace trehalázy

Zcela zásadní vlastností trehalázy je její lokalizace v rámci buňky. U huseničku *A. thaliana* je s největší pravděpodobností trehaláza enzym vázaný sekvencí hydrofobních aminokyselin na plasmalemu, s katalytickou doménou orientovanou do apoplastu (Frison *et al.*, 2007). U řady jiných rostlin, jako je například rýže *Oryza sativa* a sóji *Glycine max*, pravděpodobně takováto doména není přítomna a trehaláza tak zde patrně funguje jako rozpustný protein (Müller *et al.*, 1992; Frison *et al.*, 2007). U trehaláz některých druhů rostlin je také patrně možná vazba trehalázy na plasmalemu přes GPI (glykosylfosfatidylinositolovou) kotvu (Barraza & Sánchez, 2013). Rozpustná trehaláza je pravděpodobně například u cizrny *Cicer arietinum* (Kord *et al.*, 2013) nebo fazolu *Phaseolus vulgaris* (García *et al.*, 2005). U aktinidie *Actinidia deliciosa* (Li *et*

al., 2008) a sóji *Glycine max* (Müller *et al.*, 1992) funguje patrně trehaláza jako apoplastický enzym. Struktura trehaláz je poměrně silně konzervovaná v rámci všech organismů, ovšem platí to pouze pro jejich terciární strukturu, zejména aminokyseliny katalytické domény jsou dispergované v rámci celé délky proteinu a klíčová je tak zejména konformace proteinu (Barraza *et al.*, 2013). Trehalázy u rostlin jsou tak pravděpodobně velice variabilní a jejich lokalizace a aktivace bude stěžejním parametrem jejich úlohy a významu u daného druhu rostliny.

2.3.2. Význam trehalázy u rostlin

Poprvé byla trehaláza u rostlin popsána v roce 1969 v pylu některých jednoděložných (u čeledí Asparagaceae, Asphodelaceae a Poaceae) a dvouděložných rostlin (čeledi Solanaceae, Fabaceae a Theaceae) (Gussin *et al.*, 1969; Glasziou & Gayler, 1969) a o něco později také u čeledi Liliaceae (Gussin & McCormack, 1970). Z toho důvodu je trehaláza u rostlin považována za enzym přítomný u všech druhů, ačkoliv právě první popsaná úloha trehalázy v pylu nebyla dále téměř vůbec studována. V dalších letech byla popsána trehaláza u velkého množství druhů rostlin (Kendall *et al.*, 1990; Mailer *et al.*, 1994). Do roku 1998, kdy byly u rostlin identifikovány geny biosyntézy trehalózy (Blázquez *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1998), byla trehaláze přisuzována zejména role detoxifikační a obranná (Veluthambi *et al.*, 1981; Müller *et al.*, 1995a), jelikož trehalóza byla považována zejména za pro rostlinu toxický produkt symbiontů rostlin (Streeter, 1985). Ačkoliv existoval i názor, že trehaláza reguluje endogenní hladinu trehalózy (Glasziou & Gayler, 1969), což bylo ovšem v rozporu s všeobecným názorem, že rostliny trehalózu neprodukují. Objev všeobecné schopnosti rostlin syntetizovat trehalózu vedl k tomu, že trehaláza začala být vnímána primárně jako enzym zodpovědný zejména za degradaci endogenní trehalózy (Paul *et al.*, 2008), nikoliv tedy trehalózy exogenní jako dříve. Kromě toho je trehaláza v současnosti vnímána jako enzym neúčastnící se příliš či vůbec sacharidové signalizace, ačkoliv existují doklady o opaku (Garapati *et al.*, 2015), a bývá tak často v pracích zabývajících se trehalózovým metabolismem opomíjena.

2.3.2.1. Úloha trehalázy ve stresových reakcích

Asi nejznámější popsanou úlohou trehalózy je její účast na zvyšování odolnosti ke stresu, zejména stresu suchem, ačkoliv nejspíš nefunguje přímo jako osmoprotektant. Je možné, že i trehaláza se této odolnosti nějakým způsobem účastní. Bylo například popsáno, že u manioku *Manihot esculenta* obsahují suchu odolné variety více trehalózy a po vystavení suchu všechny variety akumulují trehalózu. U manioku jsou přitom dvě trehalázy, kdy jedna z trehaláz u většiny variet reaguje na sucho zvýšením míry exprese (Han *et al.*, 2016). To by mohlo souviset například s popsanou úlohou trehalázy ve svěracích buňkách průduchů, která byla popsána u huseníčku *A. thaliana*. Rostliny se zvýšenou expresí trehalázového genu, a tím sníženou hladinou trehalózy, zde měly podstatně vyšší odolnost k suchu a lepší schopnost regenerovat po období sucha (Van Houtte *et al.*, 2013). Je tedy poměrně zřejmé, že trehaláza zde reguluje

obsah trehalózy, který poté reguluje otevřenost průduchů (Van Houtte *et al.*, 2013; Figueroa & Lunn, 2016). Tomu nasvědčuje i pozorování, že míra exprese trehalázového genu je ve svěracích buňkách huseníčku vysoká (Park *et al.*, 2013) a míra její exprese je pozitivně regulována kyselinou abscisovou (ABA, Van Houtte *et al.*, 2013). Je však pravděpodobné, že regulační vztah mezi ABA a trehalázou zahrnuje více komponent. Důležité je zde pravděpodobně propojení regulace aktivity trehalázy a aktivity klíčového enzymu biosyntézy kyseliny abscisové, NCED3 (NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE3). Míra exprese genu pro trehalázu (Garapati *et al.*, 2015) i genu pro NCED3 (Jensen *et al.*, 2013) je u huseníčku pozitivně regulována transkripčním faktorem ATAF1 (Arabidopsis Activating Factor 1). Míra exprese trehalázového genu zvýšená ve svěracích buňkách, jak uvedeno výše, tak mohla být dána nikoliv samotnou kyselinou abscisovou, ale přes společný transkripční faktor ATAF1, anebo společným působením ATAF1 a ABA. Jak transkripční faktor ATAF1, tak ABA jsou přitom důležitou součástí odpovědi rostliny na stres. ATAF1 se účastní zejména odpovědi rostliny na stres vyvolaný nedostatkem uhlíku, tzv. carbon starvation neboli uhlíkové hladovění (Garapati *et al.*, 2015). V transkriptomu rostlin při uhlíkovém hladovění však bylo právě u huseníčku pozorováno také výrazné zvýšení míry exprese trehalázového genu bez současného výrazného zvýšení exprese ATAF1 (Cookson *et al.*, 2016), a tak může být spojení trehalázy s negativní energetickou bilancí být ještě komplexnější. Z uvedeného je poměrně zřejmé, že samotná trehaláza pravděpodobně není pouze pasivním účastníkem cukerné signalizace a jsou zde velice výrazné podobnosti s úlohou trehalóza-6-fosfátu, který funguje jako senzor energetické bilance. Trehaláza s největší pravděpodobností zasahuje do cukerné signalizace přes snižování obsahu trehalózy a současného zvyšování obsahu glukózy, což může mimo jiné vést i ke změně redoxního stavu buňky a osmotického potenciálu.

2.3.2.2. Úloha trehalázy v energetickém metabolismu

Jak uvedeno dříve, huseníček i některé jiné rostliny nejsou schopny růstu na médiu obsahujícím vyšší koncentrace trehalózy. Rostliny huseníčku overexprimující ATAF1 a potažmo i trehalázu jsou schopny lepšího růstu na trehalózovém médiu, což svědčí pro poměrně očekávatelnou úlohu trehalázy v odolnosti proti nadměrným množstvím exogenní trehalózy (Garapati *et al.*, 2015). Bylo však pozorováno také zvýšení odolnosti ke zvýšení obsahu trehalózy v kultivačním médiu nezávislé na činnosti trehalázy, spojené zejména s činností SnRK1 kinázy a transkripčního faktoru bZIP11 (Delatte *et al.*, 2011), tedy dalších dvou klíčových stresových regulátorů, spojených mimo jiné také s uhlíkovým hladověním (Cookson *et al.*, 2016). Naopak zlepšení energetické bilance rostliny huseníčku vede ke zvýšení hladiny T6P (Yadav *et al.*, 2014; Figueroa *et al.*, 2016), což vede i ke zvýšení obsahu trehalózy (Avonce *et al.*, 2004; Schluepmann *et al.*, 2004). Trehaláza může pravděpodobně za této situace ovlivňovat trehalózový metabolismus paradoxně právě tím, že se nezmění její aktivita, což ve výsledku vede ke změnám obsahu trehalózy. Smyčka by tedy za pozitivní bilance mohla fungovat například takto: zvýšení obsahu T6P vede nejprve i ke zvýšení obsahu trehalózy (Schluepmann *et al.*, 2004), které ovšem neovlivňuje aktivitu trehalázy (Müller *et al.*, 1995a) a tím dojde k akumulaci trehalózy, vedoucí k další akumulaci T6P, která zvýší aktivitu TPP (Schluepmann *et al.*,

2004), což ve výsledku vede k dalšímu zvýšení obsahu trehalózy i T6P, jde tedy o pozitivní zpětnou vazbu. Za negativní energetické bilance je poté trehaláza aktivována přes ATAF1 či bZIP11, což ve výsledku vede ke snížení hladiny trehalózy i T6P. Pro tuto spekulaci je ovšem, jak je patrné, jen minimum podkladů. Navíc existují i pozorování ukazující, že při zvýšení obsahu trehalózy dochází ke snížení exprese TPS (Park *et al.*, 2013) a zvýšení exprese trehalázy (Schluepmann *et al.*, 2004). Taková protichůdnost informací je obtížně interpretovatelná. Pravděpodobně jde o důsledek velice flexibilní a časově a místně velice specifické regulace trehalózového metabolismu (Figueroa & Lunn, 2016). Je také poměrně pravděpodobné, že hlavním regulačním mechanismem aktivity trehalázy jsou posttranslační modifikace. Situace může být také značně odlišná u huseníčku a u jiných rostlin. Například u druhů *Zea mays*, *Raphanus sativus*, *Quamoclit phoenicea*, *Phaseolus radiatus* vedla přítomnost trehalózy v médiu k výraznému zvýšení aktivity trehalázy, přičemž podobný efekt měla i sacharóza (Veluthambi *et al.*, 1981). Dalším možným propojením trehalázy s cukernou signalizací je pozorované výrazné snížení míry exprese hexokinázy 1 u rostlin huseníčku *A. thaliana* s nefunkčním genem pro trehalázu (Park *et al.*, 2013).

2.3.2.3. Úloha trehalázy v reprodukci

Velice důležitou úlohu pravděpodobně zastává trehaláza v reprodukčních orgánech a zejména v pylu. Ostatně jak zmíněno výše, právě v pylu byla poprvé trehaláza popsána (Gussin *et al.*, 1969). Míra exprese trehalázy je v reprodukčních květech huseníčku nejvyšší z celého kormusu, a to především v samčích reprodukčních strukturách (Müller *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2013). U mutantní rostliny huseníčku *A. thaliana* (ekotyp Wassilewskija) s nefunkčním genem pro trehalázu byla asi nejsilnější fenotypovou odpovědí snížená fertilita pylu (Park *et al.*, 2013). Je velice zajímavé toto pozorování porovnat se situací u květů „kiwi“ (aktinidie lahodná, *Actinidia deliciosa*). Květy aktinidie jsou zpravidla rozlišeny na samčí a samičí, kdy samčí květy mají zakrnělé pestíky a samičí květy naopak zakrnělé tyčinky produkující sterilní pyl. A právě zde spočívá souvislost s trehalázou. V tyčinkách samičích květů byla totiž pozorována minimální trehalázová aktivita a vysoký obsah trehalózy, zatímco v květech samčích byla situace opačná (Li *et al.*, 2008). Právě trehaláza tak může do jisté míry stát za cizosprašností většiny kultivarů aktinidie. U pylu mutantního huseníčku s nefunkčním genem pro trehalázu byla popsána kromě poruchy tvorby pylu i minimální schopnost růstu pylové láčky (Park *et al.*, 2013). Vysoká exprese trehalázy v pylu přitom byla zaznamenána zejména v tapetu a endotheciu (Park *et al.*, 2013), což může souviset například s výživou dozrávajícího pylového zrna. U stejných rostlin byla snížena i produkce semen, což může být spojeno s vysokou mírou exprese trehalázy v semenech u nemutovaných rostlin (Park *et al.*, 2013). Vysoká aktivita trehalázy byla zaznamenána i v dozrávajících plodech a mladých listech aktinidie (Li *et al.*, 2008), což může souviset se sinkovým charakterem těchto pletiv. Dalšími fenotypovými projevy těchto mutantních rostlin byla řada výrazných změn ve vývoji kališních a korunních lístků. Dalším důležitým propojením mezi trehalázou a vývojem reprodukčních orgánů může být i propojení T6P s cirkadiánními hodinami rostliny (Martins *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2016).

2.3.2.4. Úloha trehalázy v symbiotických interakcích

Jen velice málo je známo o účasti trehalázy v symbiotických interakcích rostlin. V podstatě jediná taková popsaná situace je symbióza některých rostlin z čeledi Fabaceae a hlízkových bakterií. Bylo popsáno, že trehalázová aktivita v hlízkách je velice vysoká (Müller *et al.*, 1994b) a je v kořenech těchto rostlin indukovaná dodáním auxinu, nikoliv však dodáním trehalózy (Müller *et al.*, 1995a), což pravděpodobně souvisí se zvýšenou hladinou auxinu v pletivu obklopujícím hlízky a hlízkách samotných (Ghosh & Basu, 2006). Bylo také pozorováno, že ošetřením kořenů sóji *Glycine max* nodulačními faktory dochází v těchto ke zvýšení trehalázové aktivity, a je zde tedy zřejmé propojení se symbiózou (Aeschbacher *et al.*, 1999). Podobný mechanismus by mohl fungovat i u mykorhizní symbiózy, jejíž vznik také bývá doprovázen lokálním zvýšením obsahu auxinu, kdy tento se pravděpodobně účastní vzniku většiny typů mykorhizní symbiózy. Auxin se účastní ustanovení arbuskulární mykorhizy (Etemadi *et al.*, 2014), a to i u sóji (Meixner *et al.*, 2016), u které popsal Müller (1995) aktivaci trehalázy auxinem, kterou dával do kontextu hlavně s hlízkovými bakteriemi. Dále se také auxin podobně uplatňuje u ektomykorhizní symbiózy (Laurans *et al.*, 2001; Duplessis *et al.*, 2005). Auxin se patrně účastní i vzniku a ustanovení orchideoidní mykorhizy, jak naznačují proteomická a transkriptomická data (Zhao *et al.*, 2013, 2014; Valadares *et al.*, 2014). Zvýšení hladiny auxinu je typické i pro napadení rostliny některými patogeny. Například v napadených pletivech huseníčku *A. thaliana* nádorovkou *Plasmodiophora brassicae* bylo pozorováno výrazné zvýšení hladiny auxinu (Devos *et al.*, 1997) a zároveň výrazné zvýšení míry exprese genu pro trehalázu (Brodmann *et al.*, 2002; Gravot *et al.*, 2011). Otázkou zůstává, jakou úlohu může případně trehaláza v takto odlišných typech interakcí mít. S velkou pravděpodobností by mohlo jít o obranu reakci související s vyššími hladinami exogenní trehalózy či určením energetické bilance pletiva, i když tato se mezi zmíněnými symbiózami velmi liší.

Co se týče trehalázy u symbiontů rostlin, je záznamů ještě méně. Aktivita trehalázy byla například v hyfách ektomykorhizní houby muchomůrky *Amanita muscaria* asociovaných s kořeny rostliny pouze šestinová oproti hyfám rostoucím asymbioticky (Wisser *et al.*, 2000). Je přitom známo, že mykorhizní houby vytvářejí často uhlíkový sink v intraradikálním myceliu konverzí rostlinných hexóz na trehalózu (López *et al.*, 2007). V tomto kontextu poté může snížení trehalázové aktivity v mykorhizách ukazovat na tvorbu uhlíkového sinku houbou. Ze strany rostliny by potom zvýšení trehalázové aktivity mohlo působit k tomuto antagonisticky. U fytopatogenní houby *Magnaporthe grisea* bylo pozorováno výrazné snížení patogenity delecí genu pro trehalázu, což může být ale dáno spíše celkovým snížením vitality houby, než změnou interakce s rostlinou (Foster *et al.*, 2003). V listech révy *Vitis vinifera* napadené fytopatogenem vřetenatkou *Plasmopara viticola* bylo pozorováno zvýšení trehalázové aktivity a celková změna charakteru pletiva na sinkové, včetně akumulace škrobu (Gamm *et al.*, 2011), což bylo pozorováno i u výše zmíněné nádorovky (Brodmann *et al.*, 2002). Právě akumulace škrobu a přeprogramování pletiva na sinkové je typickým projevem pěstování rostlin na trehalóze (Kolbe *et al.*, 2005; Delatte *et al.*, 2011; Garapati *et al.*,

2015) a v případě interakcí se symbionty může tedy sehrávat trehalázová aktivita důležitou roli v obraně rostliny. Naopak ze strany patogena je spíše pravděpodobná úloha trehalázy v patogenezi.

V případě mykorrhizních symbióz, kde dochází k přesunu uhlíkatých látek směrem z rostliny do houby je naopak průvodním znakem snížení trehalázové aktivity (např. Wisser *et al.*, 2000), což může souviset s ustáleným mutualistickým charakterem této symbiózy. U ektomykorrhizní symbiózy bylo dokonce navrženo hodnotit kvalitu a vitalitu vztahu mezi symbionty pomocí obsahu trehalózy, který je ve vitálních ektomykorrhizách vyšší (Niederer *et al.*, 1989). Je zajímavé, že obsah trehalózy a zejména trehalázová aktivita pozitivně korelují i s vitalitou vztahu mezi rostlinou a hlízkovými bakteriemi (Müller *et al.*, 1994b). U symbiózy s hlízkovými bakteriemi je také známo, že dodání nitrátu rostlině vede ke snížení počtu a velikosti hlízek a zároveň toto ošetření vede také ke snížení obsahu trehalózy a snížení aktivity trehalázy v hlízkách (Müller *et al.*, 1994a), což opět ukazuje na komunikaci mezi symbionty skrze změny trehalázového metabolismu. Zdá se, že trehaláza v symbiotických interakcích rostlin s jinými organismy pravděpodobně sehrává důležitou, i když obtížně zařaditelnou roli.

Nedostatkem uvedených studií je, že nelze rozlišit, zda trehalázová aktivita byla původem rostlinná nebo původem od daného symbionta, jelikož autoři určují jen aktivitu trehaláz, či míru exprese trehalázy jednoho ze symbiontů. Vhodnější by zde bylo změřit i míru exprese trehalázy či trehaláz obou symbiontů, což v žádné studii nebylo provedeno.

3. Materiál a metody

Veškeré experimenty zahrnuté v této práci se uskutečnily v prostorách Katedry experimentální biologie rostlin Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, Viničná 1965/5, 128 00.

3.1. Rostlinný materiál

Semena pro výsev rostlin byla získána z několika zdrojů. Semena většiny druhů byla získána z matečných rostlin v hrnkové kultuře ze sbírky Botanické zahrady hl. m. Prahy v Troji, Trojská 800/196, 171 00. Semena druhů *Pauridia capensis* a *Hypoxis hemerocallideae* byla získána od firmy Silverhill Seeds and Books, Jihoafrická republika, Kapské Město, Kenilworth 7745, 53108. Semena druhu *Hypoxis decumbens* byla získána od Späth-Arboretum Humboldtovy univerzity v Berlíně (Německo, Späthstraße 80/81, 12437).

3.2. Kultivační prostory

Výčet kultivačních prostor použitých při pěstování rostlin je uveden v tabulce 3.1. Všechny rostliny byly kultivovány ve tmě. Jednak v uzavřených plastových boxech krytých tenkou tkaninou a jednak v chladničce bez osvětlení.

označení	prostora	teplota [°C]
A	kultivační místnost S06	22±1
B	klimabox přízemí	17±1
C	chladnička	2-3

Tabulka 3.1. Kultivační prostory

3.3. Přístroje a chemikálie

Popis použitých přístrojů včetně výrobce je zahrnut přímo v textu, podobně pro vybrané chemikálie.

3.4. Kultivační média

Kultivace rostlin probíhala na několika typech médií, přičemž většina experimentů proběhla na SMS médiu (Ponert, 2009), dále pak médiích BM1 (Waes & Debergh, 1986), MoX a X0. MoX je upravená verze média Mo2 (Ponert, 2009) a X0 je samotné agarové médium. Kultivace bakterií *Escherichia coli* probíhala na médiích SOC (Hanahan, 1983) a LB (Bertani, 1951). Složení médií viz Příloha 1.

3.4.1. Kultivační média – postup přípravy

Všechna média používaná pro kultivaci rostlin byla ve zpěvněné formě, čehož u všech médií kromě BM1 bylo dosaženo přidáním příslušného množství agaru. V médiu BM1 byl použit jako gelující agens Gelrite®. Roztoky pro přípravu médií byly uchovávány ve zmraženém stavu a před přidáním do média zcela rozmrazeny. Kromě roztoku validamycinu A byly všechny složky média přidávány do roztoku před autoklávováním.

Do kádinky o objemu 2 l byl nejprve přidán přibližně 1 l destilované vody a elektromagnetické míchadlo a kádinka byla následně umístěna na elektromagnetickou míchačku. Za stálého míchání byly postupně přidávány složky média (viz Příloha 1). Po rozpuštění roztoku byl tento přelit do odměrného válce o objemu 2 l a doplněn na finální objem 2 l destilovanou vodou. S výjimkou SMS média byl takto vytvořený roztok přelit zpět do 2l kádinky a za mírného míchání míchadlem upraveno jeho pH na 5,8 pomocí 0,1M KOH či HCl s použitím pH metru Orion 410 A+. Médium SMS bylo zpravidla připravováno ve čtyřech modifikacích a proto byly 2 l roztoku rozděleny do čtyř kádinek po 0,5 l. Do každé kádinky pak byly přidány příslušné odlišné složky (viz Příloha 1) – sacharóza, glukóza, trehalóza a do čtvrté kádinky žádný sacharid nebyl přidán. Vzhledem k tomu, že SMS médium obsahuje aktivní uhlí, které se rychle usazuje, bylo před přelitím roztoku do kádinek nutné rozmíchat sloupec roztoku tak, aby aktivní uhlí bylo v roztoku rovnoměrně rozděleno. Po přidání sacharidů bylo upraveno pH roztoku na 5,8 pomocí 1M roztoků NaOH a HCl. Po upravení pH byla média přelita do 0,5l autoklávovatelných skleněných lahví, a kromě BM1 média bylo v této fázi do každé lahve přidáno 3,5 g agaru. Lahve byly následně utaženy plastovým víčkem tak, aby mohlo mezi vnitřním a vnějším prostředím lahve docházet k výměně plynů. Lahve a jejich obsah byly poté sterilizovány v autoklávu Tuttnauer 2540EK-N (121 °C, 0, 0,144 MPa, 20 min). Po sterilizaci byla média v lahvích přenesena do laminárního flow-boxu a ve sterilním prostředí rozlita do sterilních plastových Petriho misek (Ø 9 cm). V průběhu nalévání médií byla média v lahvích průběžně promíchávána krouživými pohyby. V případě média s validamycinem A byl roztok validamycinu přidán do média také ve flow-boxu, před rozlitím média do misek, pomocí automatické pipety se sterilními plastovými špičkami.

3.5. Sterilizace nástrojů a materiálu

Nástroje (skalpely, pinzety, špachtle a jehly), skleněné Petriho misky apod. byly sterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru Binder při teplotě 150 °C po dobu 3 hodin. Petriho misky byly předtím zabaleny v alobalu a nástroje uloženy do skleněných zkumavek uzavřených alobalem.

Při práci ve flow-boxu byly kovové a skleněné nástroje průběžně namáčeny do 96% ethanolu a opalovány nad plynovým kahanem.

Voda, média, párátko, plastové špičky pro automatické pipety apod. byly sterilizovány v autoklávu Tuttnaurem 2540EK-N (121 °C, 0,144 MPa, 20 min). Sterilizování roztoků termolabilních látek bylo provedeno pomocí sterilizačních filtrů 0,22 µm (Rotilabo-Spritzenfilter®). Před pracemi s *E. coli* bylo

prostředí flow-boxu a některé nástroje a materiál (automatické pipety, parafilm, plastové špičky, mikrozkrumavky, skleněné tyčinky) sterilizováno pomocí UV záření.

3.6. Získání a zpracování rostlinného materiálu

Veškerý rostlinný materiál získaný kultivací *in vitro* byl odvozen z asymbiotického výsevu semen.

Rostlinný materiál použitý pro extrakci genomové DNA (experiment DNA1, viz dále) byl získán z dospělých rostlin ze sbírky Botanické zahrady v Praze-Troji. Jejich značení je obdobné jako u kultur *in vitro* a též jsou uvedeny v Příloze 2. V Příloze 2 je zahrnuto i bližší taxonomické zařazení všech druhů použitých v této práci.

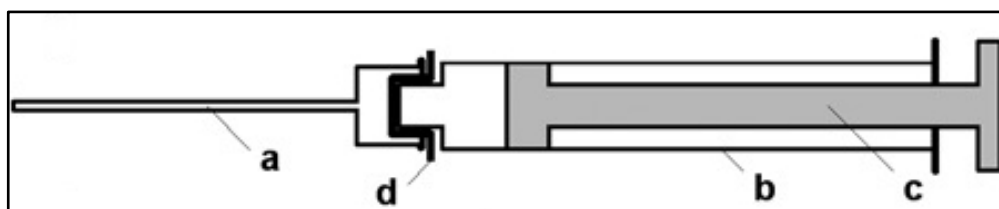
3.6.1. Skladování semen a příprava na výsev

Semena pro výsevy byla skladována v papírových sáčkích v uzavřeném boxu se silikagelem většinou v celých uschlých semenících, případně ze semeníku uvolněná. Skladována byla ve tmě při pokojové teplotě, nebo ve 13 ± 1 °C. Před výsevem byla semena nejprve vyseparována ze semeníku pomocí nástrojů jako skalpel, jehla apod. Takto uvolněná semena byla přečištěna pinzetou od zbytků semeníku a nečistot.

3.6.2. Sterilizace semen

3.6.2.1 Sterilizace semen čeledi Orchidaceae

Semena většiny druhů (výjimky budou dále uvedeny) byla sterilizována tímto postupem (podle Ponert *et al.*, 2011): Nejprve byl připraven secí aparát. Ten se sestával z 5 ml injekční stříkačky (P-LAB as., Praha 3, Olšanská 2643/1a, 130 00), jehly 1,2x40 mm (S.A.B. Impex, s.r.o., Brno, Firemní 710/2, 619 00) a jemné nylonové síťoviny (viz obrázek č. 3.1.).



Obrázek 3.1. Secí aparát použitý při výsevech semen (podle Ponert *et al.* 2011): a – jehla, b – stříkačka, c – píst, d – síťovina.

Čtverec síťoviny o straně přibližně 1 cm byl překryt přes hrdlo stříkačky a na hrdlo se síťovinou nasazena jehla. Do injekční stříkačky byla vsypána připravená semena pomocí přeloženého čtverce papíru. Stříkačka byla uzavřena pístem. V injekční stříkačce byly během sterilizace vystřídány různé tekutiny po danou dobu.

Standardní postup sterilizace:

1. 4 min 70% ethanol, průběžně protřepáváno
2. 3x destilovaná voda, ve čtvrté dávce vody ponecháno do dalšího kroku po dobu několika desítek minut za občasného protřepání

Odsud již práce probíhala ve sterilním prostředí laminárního flow-boxu

3. 2x 2,5 min 5% chlorové vápno $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ + Tween 20 (příprava viz dále), průběžně protřepáváno – roztok byl vždy připraven těsně před sterilizací
4. 4x sterilní destilovaná voda, nasáto z Erlenmayerovy baňky překryté alobalem propíchnutím alobalu předem opáleného nad plynovým kahanem
5. nasáto vhodné množství (přibližně 2 ml) sterilní destilované vody pro výsev
6. sejmuta jehla 1,2x40 mm spolu se síťovinou a nahrazena jehlou 1,8x40 mm (S.A.B. Impex) bez síťoviny
7. voda se semeny byla vytlačena ze stříkačky do Petriho misek s médiem
8. Petriho misky byly uzavřeny pomocí dvou pruhů (10x 2 cm) parafilmu (P-LAB)

Příprava roztoku chlornanu vápenatého:

1. do kádinky nasypáno 20 g komerčního chlorového vápna (KITTFORT PRAHA, s.r.o, Praha, Radlická 2/608, 15000)
2. přililo 100 ml destilované vody, směs rozmíchána a nechána nejméně 15 min za občasného promíchání rozpouštět
3. směs byla přefiltrována přes filtrační papír
4. do přefiltrovaného roztoku přidána pomocí automatické pipety s ustřiženou plastovou špičkou kapka smáčedla Tween 20 (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha, Pobřežní 249/46, 186 00)
5. roztok promíchán

Tento postup sterilizace byl použit pro kultury DM (*Diuris magnifica*), LUD (*Ludisia discolor*), NZ1 (*Neuwiedia zollingerii*), PB (*Paphiopedilum barbatum*), PN (*Paphiopedilum niveum*), PLM (*Pleione maculata*) a TN (*Thelymitra nuda*; viz Příloha 1).

3.6.2.2. Sterilizace semen čeledi Hypoxidaceae

Tento postup se vztahuje na semena druhů pro kultury HYP (*Hypoxis hemerocallidea*), HYD (*Hypoxis decumbens*) a PAUR (*Pauridia capensis*), viz Příloha 2. Část semen pro výsev těchto kultur byla nejprve skarifikována, a to různými způsoby (viz příloha 2) a všechna semena byla poté ošetřena roztokem GA_3 + sacharóza (složení a příprava viz Příloha 1) po dobu 20 hod. Semena poté byla, kromě semen druhu *Hypoxis hemerocallidea*, ošetřena roztoky uvedenými v tabulce v Příloze 2 pomocí injekční stříkačky (příprava secího aparátu a jeho používání viz výše). Mezi jednotlivými kroky byla semena podobně jako u výše uvedeného standardního postupu promývána destilovanou vodou. Po ošetření sterilizačním roztokem (5% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, nebo 3,5% NaOCl , viz příloha 2) byla práce se semeny prováděna ve sterilním prostředí laminárního flow-boxu.

Semena pro výsev kultur HYP (*Hypoxis hemerocallidea*), která jsou příliš velká pro výsev přes hrdlo stříkačky. V poslední fázi tedy byla semena s vodou vylita do sterilní baňky a odtud přendána na misky sterilní

pinzetou. Jinak byl postup u těchto semen shodný s výše uvedeným postupem pro semena druhů *Hypoxis decumbens* (HYD) a *Pauridia capensis* (PAUR).

Ostatní kroky postupu výsevu byly shodné s výše uvedeným standardním postupem.

Roztok NaOCl byl získán naředěním komerčního prostředku SAVO (Unilever s.r.o, Praha, Rohanské nábřeží 670/17, 186 00).

3.6.2.3. Výsev a sterilizace nezralých semen druhu *Neuwidia zollingerii*

Tento experiment byl veden pod jménem NZ2.

Semeníky s nezralými semeny byly ponechány na 10 min pod tekoucí vodou

1. 2 min 70% ethanol
2. 10 min destilovaná voda

Od této fáze probíhala práce ve sterilním prostředí laminárního flow-boxu

3. 5 min 5% chlornan vápenatý + Tween 20 (příprava viz výše)
4. sterilní voda 2x
5. na sterilní skleněné Petriho misce byla semena vypreparována z tobolky pomocí sterilních nástrojů (skalpel, jehla apod.) a přenesena na Petriho misku s médiem
6. zbytek postupu výsevu je shodný se standardním postupem

3.6.3. Média použitá pro výsev rostlin

Pro výsev semen kultur DM (*Diuris magnifica*), LUD (*Ludisia discolor*), PB (*Paphiopedilum barbatum*), PN (*Paphiopedilum niveum*), PLM (*Pleione maculata*) a TN (*thelymitra nuda*) byly použity modifikace SMS média: SMS (s sacharózou), SMG (s glukózou), SMT (s trehalózou) a SMK (bez cukrů), kde SMK je SMS médium bez sacharidů, písmeno „K“ je zkratkou slova kontrola. Složení těchto médií viz Příloha 1.

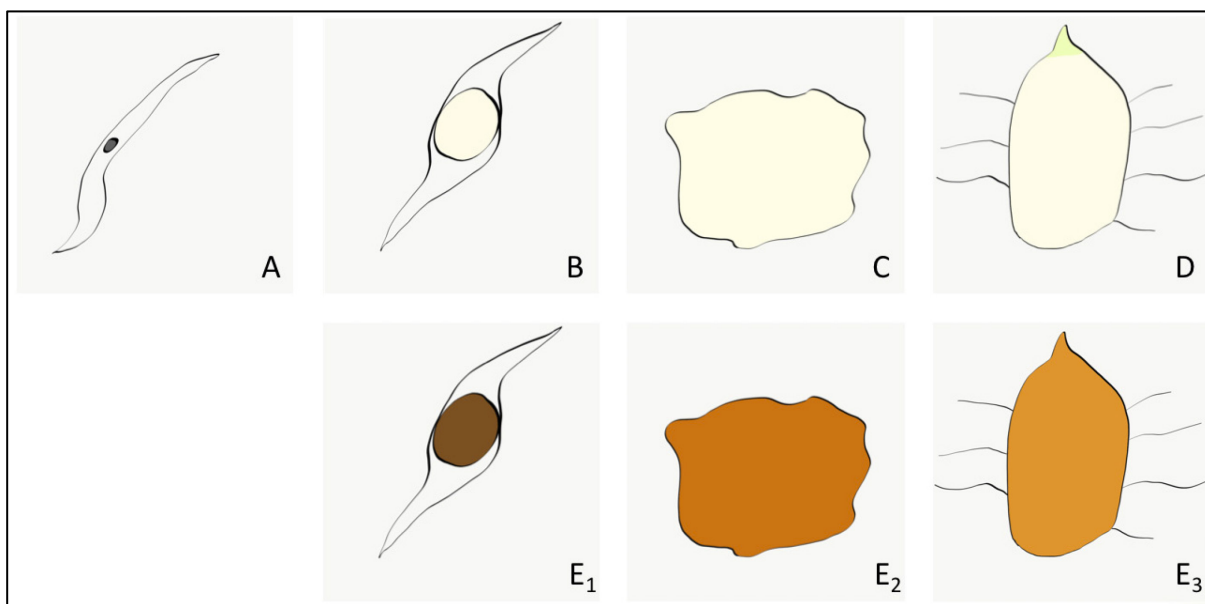
Semena pro kultury HYD (*Hypoxis decumbens*), HYP (*Hypoxis hemerocallidea*) a PAUR (*Pauridia capensis*) byla vyseta na řadu různých médií, kombinace jsou uvedeny v Příloze 2.

3.6.4. Dokumentování a sklizení rostlinného materiálu

3.6.4.1. Stanovování klíčivosti a úmrtnosti semen

Tyto parametry byly určeny pozorováním rostlinného materiálu pod stereomikroskopem MSZ 5400 Stereo Zoom Microscope (A. Krüs Optronic GmbH, Německo, Hamburg, Alsterdorfer strasse 276-268, 22297) pod zvětšením 40x. Po změření těchto parametrů byly rostliny co nejrychleji s limitem 24 hodin vyfoceny a zpracovány pro další analýzy.

Parametry klíčivosti a úmrtnosti byly stanoveny z poměrů počtů objektů z pěti kategorií, do kterých byl rostlinný materiál rozdělen (schématické znázornění kategorií viz obrázek 3.2.). Z každé misky bylo do těchto kategorií rozřazeno minimálně 150 objektů. Vzorci pro vypočtení parametrů klíčivosti a úmrtnosti viz obrázek 3.3., který se odkazuje na obr. 3.2.



Obrázek 3.2. Kategorie zavedené pro vyhodnocení klíčivosti semen orchidejí. A – semeno buďto nezralé s nedovyvinutým embryem, nebo s poškozeným, či chybějícím embryem, B – semeno nevyklíčené se standardně vyvinutým embryem, C – semeno vyklíčené, s protrženým osemením, bobtnající, D – protokorm zpravidla s vyvinutými vlásky, E1, E2 a E3 – odumírající, nebo odumřelé útvary (ztmavlé) odpovídající kategoriím B, C a D.

$\text{Klíčivost} = \frac{C+D+E_2+E_3}{B+C+D+E_1+E_2+E_3} \times 100$	$\text{Úmrtnost} = \frac{E_1+E_2+E_3}{B+C+D} \times 100$
---	--

Obr. 3.3. Vzorce použité pro výpočet parametrů klíčivost a úmrtnost

3.6.4.2 Fotodokumentace

Předtím, než byl rostlinný materiál sklizen, byla zdokumentována jeho podoba. Petriho misky s kulturami byly vyfotografovány fotoaparátem Canon 760D s makroobjektivem Canon Macro Lens EF 100 mm USM 1:2,8 (Canon Cz s.r.o, Praha, Jankovcova 14, 170 00). Fotografie byly pořízeny s pomocí stativu Kaiser RS1 (Kaiser Fototechnik GmbH & Co.KG, Německo, 74711 Buchen, 1262) pro dosažení maximální přesnosti zachycení velikosti klíčících semen a protokormů. Osvětlení bylo zajištěno čtyřmi LED žárovkami. Pro dosažení dobrého kontrastu byly Petriho misky foceny na černém podkladu. Část fotografií, které vyžadovaly větší přiblížení, byly vyfoceny pomocí fotoaparátu spojeného s binokulární lupou (Olympus SZ X7, Olympus Czech group, s.r.o., Praha, Evropská 176, 1641).

Protokormy z kultury PLM (*Pleione maculata*) byly před focením vyjmuty z Petriho misek a vyskládány na skleněné Petriho misky. A to z důvodu, že tyto protokormy v původních Petriho miskách rostly do značné míry vertikálně vzhledem ke směru focení a analýza velikosti protokormů z fotek původních Petriho misek by tak nebyla možná.

3.6.4.3 Sklizení rostlinného materiálu

Rostlinný materiál byl po spočtení údajů nutných k vyhodnocení klíčivosti a úmrtnosti semen a po vyfocení zpracován pro další analýzy:

1) Vzorky pro analýzu sacharidů v rostlinném materiálu

- Materiál z části Petriho misek dané kultury byl pomocí zahnuté pinzety, která byla mezi jednotlivými miskami čištěna buničitou vatou (P-Lab), přenesen do předem zvážených a nadepsaných 1,5ml mikrozkuvek s propíchnutým víčkem a naplněné mikrozkuvky byly co nejrychleji přeneseny do tekutého dusíku. Víčka mikrozkuvek bylo nutné předem propíchnout, aby mohlo při následném mrazovém vysoušení docházet k odpařování, a aby mikrozkuvky neexplodovaly. Do každé mikrozkuvky bylo přeneseno maximálně 200 mg materiálu. Hmotnost jednotlivých vzorků byla určena pomocí analytických vah (Sartorius AG, Německo, Göttingen, Weender str. 94-108, 37075) a zaznamenána. Do dalšího zpracování byly vzorky uchovávány při -80 °C.

2) Vzorky pro izolaci RNA

- Materiál z druhé části Petriho misek byl přenesen do mikrozkuvek s kulatým dnem a uzávěrem Safe-Lock (Eppendorf, Říčany, Kolovratská 1476/24, 251 01) spolu se dvěma nerezovými kuličkami. Do každé mikrozkuvky bylo přeneseno 45-55 mg materiálu. Váha materiálu byla zaznamenána. Naplněné mikrozkuvky byly co nejrychleji přeneseny do tekutého dusíku. Do dalšího zpracování byly vzorky uchovávány při -80 °C.

3) Vzorky pro analýzu sacharidů v médiu

- Z Petriho misek byla odebrána část média, a to vždy v místech, kde byla před sklizením přítomna semena či protokormy. Odebráno bylo z každé misky 0,45-0,55 g média a toto bylo přeneseno do mikrozkuvek spolu s 0,5 ml ultračisté (MiliQ) vody. Další postup viz kapitola 3.6.5.1.

3.6.4.4. Analýza obrazu

Dalším hodnoceným parametrem byla velikost objektů. Změřena byla velikost všech vyklíčených semen a protokormů, tedy všech objektů kromě objektů z kategorie A, B a E1. Z každé Petriho misky bylo změřeno alespoň 100 objektů. Měření bylo provedeno pomocí programu ImageJ 1.50i (Schneider *et al.*, 2012). V prostředí tohoto programu bylo vždy nejprve nastaveno měřítko podle vyfocené pravítka (funkce „set scale“) a podle této informace program převedl velikost v pixelech na metrické jednotky. Velikost objektů byla měřena jako maximální průměr objektu zpravidla v μm se třemi desetinnými místy, pomocí funkce „straight line“. Jiný způsob měření byl použit pro měření objektů kultury PLM (*Pleione maculata*). Zde byly objekty změřeny funkcí „freehand selection“ a velikost byla vyjádřena jako plocha v μm^2 se třemi desetinnými místy.

3.6.5. Analýza obsahu sacharidů

3.6.5.1. Extrakce rozpustných sacharidů z rostlinného materiálu

Mikrozkumavky s odebranými vzorky (viz kap. 3.6.4.3.) byly přeneseny do lyofilizátoru Lyovac GT 2 (Finn-Aqua, Francie, Bordeaux, 116 Avenue de Magudas, 33185 Le Haillan) a mrazově vysušeny po dobu přibližně 20 hodin. Po vysušení byly vzorky opět zváženy na analytických vahách. Poté bylo do každé mikrozkumavky přidáno 0,5 ml 80% methanolu. Vzorky byly poté inkubovány na termobločku Grant QBT1 (Grant Instruments Ltd, Spojené království, Shepreth, 29 Station Road, SG8 6GB) při teplotě 75 °C po dobu 30 min. V další fázi byl methanol vakuově odpařen pomocí přístroje Speedvac Concentrator Plus (Savant, Thermo Fisher Scientific, s.r.o., Pardubice, Kosmonautů 324, 53009) na program V-AL, při teplotě 45 °C, 3 hodiny. Do mikrozkumavek bylo následně přidáno množství ultračisté vody odpovídající hmotnosti sušiny vzorku podle tabulky č. 3.2. Následně byly vzorky sonifikovány v ultrazvukové lázni Sonorex (Bandelin electronic GmbH & Co, Německo, Berlín, Heinrichstraße 3-4, 12207) po dobu 15 minut. Následně byly vzorky centrifugovány 10 minut při 14000 rpm (otáček za minutu, z angl. revolutions per minute) v centrifuze Centrifuge 5415 D (Eppendorf). Poté byl supernatant přesunut do nových mikrozkumavek: nejprve pomocí injekční stříkačky Luer Lock 5 ml (P-Lab) s kompatibilní jehlou 1,2x40 mm (S.A.B. Impex) byl supernatant nasát a poté byla jehla vyměněna za plastový filtr (porozita 0,22 µm, Millex Milipore, Merck spol. s r.o., Praha, Na Hřebenech II 1718/10, 14000) a nasátý supernatant byl přes filtr vypuzen do nové mikrozkumavky. Takto připravené vzorky byly skladovány při -20 °C a použity k analýze obsahu rozpustných sacharidů.

suchá váha [mg]	voda [ml]
<5	0,3
5 – 10	0,5
10 – 20	1,0
20 – 30	1,5

Tabulka 3.2. Objem vody přidávaný ke vzorkům při extrakci rozpustných sacharidů

Vzorky Pro stanovení obsahu sacharidů v médiích byly nejprve ponechány přibližně 4 hodiny při 4 °C v chladničce. Poté byla tekutá fáze přesunuta do nových mikrozkumavek: nejprve pomocí injekční stříkačky Luer Lock 5 ml (P-Lab) s kompatibilní jehlou 1,2x40 mm (S.A.B. Impex) byla tekutá fáze nasáta a poté byla jehla vyměněna za plastový 0,22 µm filtr (Millex Milipore) a nasátá fáze byla vypuzena do nové mikrozkumavky. Takto připravené vzorky médií byly již připraveny k analýze obsahu sacharidů a skladovány při -20 °C.

3.6.5.2. Extrakce škrobu z rostlinného materiálu

V této fázi byly využity pelety zbylé po extrakci rozpustných sacharidů v původních mikrozkuřavkách, skladované při -80 °C. Pelety byly zbaveny zbylých rozpustných sacharidů pro maximální přesnost měření obsahu škrobu čtyřnásobným zopakováním tohoto postupu, který je modifikací shora uvedeného postupu pro extrakci rozpustných sacharidů:

- 1) přidán 1 ml ultračisté vody
- 2) silné zvortexování
- 3) 15 min ultrazvuková sonikace
- 4) 15 min centrifugace 14000g
- 5) odsátí supernatantu injekční stříkačkou

K promytým peletům bylo přidáno 0,5 ml 0,1M acetátového pufru (příprava viz Příloha 2) a vzorek byl jehlou v mikrozkuřavce jemně rozmíchán. Poté byly vzorky autoklávovány v autoklávu Tuttnaurem 2540EK-N (121 °C, 0,144 MPa, 20 min). Po vychladnutí vzorků na 4 °C k nim bylo přidáno 100 µl enzymatického roztoku pro štěpení škrobu (příprava viz Příloha 1). Následně byly vzorky inkubovány po přibližně 12 hodin v termobločku při teplotě 40 °C. Po tomto ošetření byly enzymy inaktivovány zahřátím po 5 minut v termobločku na teplotu 95 °C. Poté byla voda ze vzorků odpařena přístrojem SpeedVac po dobu 3 až 4 hodin na program V-AQ při teplotě 60 °C. Následně bylo ke vzorkům přidáno množství ultračisté vody odpovídající množství vody přidanému k danému vzorku při extrakci rozpustných sacharidů. Vzorky poté byly sonifikovány po dobu 15 minut a poté 10 minut centrifugovány při 14000 rpm. Supernatant byl do nových mikrozkuřavek přenesen stejným způsobem jako při extrakci rozpustných sacharidů (viz výše). Do dalšího kroku byly vzorky skladovány při -20 °C.

3.6.5.3. Stanovení obsahu sacharidů

Analýza byla provedena pomocí HPLC (z anglického High-Performance Liquid Chromatography) s refraktometrickou detekcí.

Parametry systému:

- a) refraktometrická detekce Shodex RI-71 (Shova Denko Europe GmbH, Německo, Konrad-Zuse-Platz 3, 81829)
- b) isokratická pumpa DeltaChrom SDS 030 (Watrex), nebo SISw HPI300 (Science Instruments and Softwares s.r.o., Praha, Feltrovská 59, 16000)
- c) kolony Watrex Pb²⁺, nebo Shodex Ca²⁺, s příslušnými předkolonami
- d) standardy sacharidů Sigma-Aldrich
- e) objem vzorku 50 µl, nástřik 10 µl, teplota kolony 80 °C, rychlost průtoku 0,5 ml/min, mobilní fáze ultračistá voda
- f) software: Clarity (DataApex, Praha, Petržílkova 2583/13, 15800)

3.7. Práce s bakteriemi *Escherichia coli*

Byl použit kmen bakterií *E. coli* JM109, tyto byly skladovány při teplotě -80 °C. Elektrokompetentní bakterie byly připravené podle M. Dostálové (Dostálová, 2016).

3.7.1. Média a kultivace

Při práci s bakteriemi byla použita média LB a SOC (složení, příprava a skladování viz Příloha 1). LB médium bylo používáno v pevné formě s přidaným kanamycinem a v tekuté formě bez kanamycinu.

3.7.2. Transformace bakterií

Celý následující postup byl prováděn s co nejkratšími prodlevami mezi jednotlivými kroky. Nejprve bylo v mikrozkušavce rozmrazeno 40 µl elektrokompetentních bakterií a k nim přidány 2 µl legačního roztoku s transformovaným plazmidem (viz kapitola 3.8.4.3.) a plastovou špičkou byla vzniklá směs jemně promíchána a následně ponechána 1 minutu inkubovat na ledu. Poté bylo přeneseno 50 µl suspenze do elektroporační kyvety, a to pomalým vypuzením z pipety po stěně kyvety. Ta byla předem vychlazená na ledu a těsně před použitím otřena buničinou do sucha. V suspenzi v kyvetě nesmí být přítomny vzduchové bubliny. Poté byla suspenze vystavena pulzu elektrického proudu o napětí 2500 V pomocí přístroje Eppendorf Eporator. Do suspenze byl co nejrychleji pipetou přenesen 1 ml SOC média a suspenze byla silně míchána pipetováním. Obsah kyvety byl poté vylit do připravené zkumavky a ta byla uzavřena víčkem. Takto připravené zkumavky byly co nejrychleji přeneseny na orbitální třepačku Certomat (Sartorius AG). Bakterie byly poté v nakloněných zkumavkách hodinu inkubovány při třepání 180 rpm při teplotě 37 °C. Následně byly bakterie ve sterilním prostředí laminárního flow-boxu přeneseny na Petriho misky s pevným LB médiem obsahujícím kanamycin.

Suspenze byla na médiu třena pomocí zahnutých sterilních skleněných tyčinek do vysušení, aby během další kultivace vznikly oddělené kolonie. Misky byly poté inkubovány v 37 °C v inkubačním boxu, a to víčkem směrem k zemi a dnem směrem nahoru. Tento postup brání kondenzaci a zkapávání vody na bakterie, což by vedlo k rozmytí a smísení kolonií. Po přibližně 12 hodinách byly vzniklé kolonie ve sterilním prostředí pomocí sterilních párátek rozčárkovány na nové misky s LB médiem a následně kultivovány po 24 hodin obdobným způsobem jako uvedeno výše. Po této inkubaci byly misky uchovávány do dalšího zpracování v chladničce při 4 °C.

Po výběru kolonií obsahujících hledanou sekvenci (viz kap. 3.8.4.4.) byly tyto ve sterilním prostředí přeočkovány pomocí sterilních párátek. Ta byla vhozena do zkumavek s 3 ml tekutého LB média. Zkumavky byly poté uzavřeny víčkem a v šikmé poloze inkubovány při teplotě 37 °C za třepání 180 rpm po dobu přibližně 12 hodin.

3.8. Práce s nukleovými kyselinami

3.8.1. Izolace RNA

Vzorky rostlinného materiálu v mikrozkuvkách připravené podle postupu v kapitole 3.6.4.3. byly nejprve homogenizovány drcením pomocí kuličkového mlýnku MM301 (Retsch GmbH & Co. KG, Německo, Haan, Rheinische str. 36, 42781) tímto postupem:

- 1) zmrazení vzorků a teflonových stojanů pro vzorky v tekutém dusíku
- 2) drcení mlýnkem pod dobu 5 minut při frekvenci 30 Hz
- 3) zopakování kroků 1 a 2

Vlastní izolace RNA ze vzorků byla provedena pomocí kitu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Německo, Hilden, Qiagen str. 1, 40724) podle protokolu výrobce. Po izolaci byla změřena koncentrace získané RNA na přístroji NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

3.8.2. Přepis RNA do cDNA

Většina prací od této chvíle probíhala na ledu. Nejprve byly vzorky naředěny destilovanou vodou na koncentraci 1 µg RNA/7,5 µl destilované vody. Dále byla ve vzorcích degradována DNA inkubací s DNázou po dobu 30 minut při teplotě 37 °C, s přidanými chemikáliemi podle tabulky 3.3.

Chemikálie	množství [µl]
10x reakčního pufru MgCl ₂ (Thermo Fisher scientific)	1
DNáza 1 (Thermo Fisher scientific)	1
RiboLock, inhibitor RNáz (Thermo Fisher scientific)	0,5

Tabulka 3.3. Směs použitá pro degradaci DNA

Dále bylo do roztoku přidáno 0,5 µl 50mM EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) a výsledný roztok inkubován při teplotě 65 °C po dobu 10 min, což vedlo k inaktivaci DNázy. Následně bylo do nové mikrozkuvky přeneseno 5 µl vzorku, 1 µl oligo-T primeru a 6,5 µl destilované vody a výsledný roztok byl zahřát po dobu 5 minut na teplotu 70 °C a následně byly vzorky rychle přeneseny na led, což dohromady vedlo k eliminaci případných RNA vlásenek. Následovala vlastní reverzní transkripce na cDNA (komplementární DNA). Ke vzorkům bylo nejprve přidáno 4 µl 10x reakčního pufru RT buffer (Thermo Fisher Scientific), 2 µl dNTP (deoxynukleotidtrifosfátů), 0,5 µl RiboLock a výsledný roztok byl inkubován po dobu 5 minut při teplotě 41 °C, aby došlo k rozvolnění RNA. Následně byl ke vzorkům přidán 1 µl reverzní transkriptázy Reverse Aid RT (Thermo Fisher Scientific) a roztok inkubován nejprve po dobu 60 minut při teplotě 42 °C (transkripce) a poté po dobu 10 minut při teplotě 70 °C (inaktivace reverzní transkriptázy).

3.8.3. Izolace DNA

Vzorky pro izolaci DNA byly připraveny z listů dospělých rostlin. Do mikrozkuvek s kulatým dnem a uzávěrem SafeLock (Eppendorf) bylo přeneseno 40-90 mg rostlinného materiálu a přidány dvě nerezové kuličky. Poté byly vzorky homogenizovány drcením obdobně, jako je popsáno v kapitole 3.8.1.

DNA byla izolována pomocí kitu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) podle protokolu výrobce a výsledná koncentrace změřena na přístroji NanoDrop 2000.

3.8.4. Design primerů pro PCR

Primery pro trehalázové geny orchidejí byly připraveny na základě sekvencí orchidejí získaných z dostupných databází a také sekvencí získaných dříve naší laboratoří a jejich alignmentu (viz kapitola 3.9.). Nejprve byly v alignovaných sekvencích vytipovány konzervované úseky s co nejvyšší sekvenční komplexitou. Poté byly pomocí algoritmů webové aplikace OligoCalc (Kibbe, 2007) určeny charakteristiky vytipovaných úseků. Bylo zkontrolováno, že tyto úseky netvoří vlásenky nebo vzájemně nekomplementují. Zároveň pomocí stejné webové aplikace byly určeny teploty tání primerů a podle této informace byly forward (komplementární k 5' konci sekvence) a reverse (reverzně komplementární ke 3' konci sekvence) primery navrženy tak, aby měly tyto teploty podobné. Dále bylo nutné zkontrolovat, zda forward a reverse primery nekomplementují, což bylo provedeno pomocí webové aplikace Multiple primer analyzer (Thermo Fisher Scientific). Seznam primerů viz tabulka 3.4. Některé primery jsou v několika pozicích, které byly v alignmentu variabilní, degenerovány. V této tabulce je zahrnut i pár primerů pro pozitivní kontrolu, tyto nasedají na sekvence ohraničující mezerníky – ITS (z anglického Internal transcribed spacer).

ITS primery byly navrženy podle práce Sun *et al.*, 1994.

Označení	Sekvence (5'→3')
TRE-S-2F	GCTTACAACACCACTGGTGCAATGC
TRE-S-2R	GCATTGCACCACTGGTGTTGTAAGC
TRE-S-3F	GWCTACCTAAAITCGAGIGCAAC
TRE-S-3R	GCATTGCACCACTGGTGTTGTAAGC
TRE-S-4F	TTAAICGAGCCAACCTCCW
TRE-S-4R	CATTGCACCACTGGTGTTGTA
ITS-26SE-F	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCTG
ITS-26SE-R	GAATTCCTCGGTCGCTCGCCGTTAC

Tabulka 3.4. Použité primery. I – inosin, W – cytosin/thymin.

3.8.5. PCR

Metoda PCR (z anglického Polymerase Chain Reaction) byla použita k namnožení hledaných sekvencí s využitím výše zmíněných primerů. Nejprve byl připraven tzv. premix – směs ingrediencí společných všem roztokům. Složení PCR premixu viz tabulka 3.5., bez modře vyznačených polí. Jako negativní kontrola sloužily vzorky bez přidaného templátu. Jako pozitivní kontrola sloužily vzorky s přidaným párem ITS primerů namísto páru navržených primerů. Vzorky sloužící k namnožení hledané sekvence obsahovaly všechny složky podle tabulky 3.5.

Složka	objem (μl)/30 μl	objem (μl)/110 μl	objem (μl)/240 μl	objem (μl)/480 μl
počet vzorků	1	5	10	20
Destilovaná voda	24,4	89,5	195,4	390,7
Dream Taq pufr (Thermo Fisher Scientific)	3	11	24	48
Nukleotidy	0,6	2,2	4,8	9,6
Forward primer	0,6	2,2	4,8	9,6
Reverse primer	0,6	2,2	4,8	9,6
Templát	0,6	2,2	4,8	9,6
Dream Taq polymeráza (Thermo Fisher Scientific)	0,18	0,66	1,44	2,88

Tabulka 3.5. použitý PCR premix, rozpis pro různé objemy. Modře jsou označeny složky, které nejsou součástí premixu, a které jsou variabilní mezi vzorky.

3.8.6. Izolace namnožených sekvencí

3.8.6.1. Elektroforéza

Produkty vzniklé v PCR reakci byly rozděleny pomocí elektroforézy na agarózovém gelu (1,2% agaróza, 0,01% GelRed – Biotium, USA, Fremont, Landing Pkwy 46117, 94538) s pufrem 0,5xTAE (Tris-Acetát-EDTA, Sigma Aldrich). Na začátku pod napětím přibližně 30 V a od 5té minuty při napětí přibližně 70 V po dobu přibližně 45 minut. Do jamek v gelu bylo od každého vzorku nanášeno 10 μl roztoku obsahujícího 10 μl vzorku a 2 μl barvy Loading Buffer (Thermo Fisher Scientific). Vizualizace produktů na gelu byla zajištěna pomocí UV indukované fluorescence v přístroji G:box (Syngene, Spojené Království, Cambridge, Nuffield Road, CB41TF) a dokumentace zajištěna programem GeneSnap 7.12 (Syngene).

3.8.6.2. Izolace produktů z gelu

Části gelu obsahující namnožené sekvence (tzv. proužky neboli bandy) byly pod UV zářením vyříznuty skalpelem a přeneseny do nových, předem zvážených mikrozkušavek a hmotnost gelu zvážena. Sekvence z gelu byly následně izolovány pomocí kitu QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (Qiagen), a to podle protokolu výrobce.

3.8.6.3. Ligace a zaklonování produktů

Produkty byly následně ligovány do plazmidu pDrive pomocí kitu PCR Cloning Kit (Qiagen) podle protokolu výrobce. Vzniklý ligační roztok byl poté odsolen pomocí speciálních kolonek. Tyto kolonky byly vytvořeny z mikrozkupek naplněných odsolovacím médiem (viz Příloha 2), kdy v médiu byly pomocí plastových špiček pro automatické pipety předem vytvořeny jamky. Do jamky bylo přeneseno 10 µl vzorku a vzorky byly následně v kolonkách inkubovány po dobu přibližně 3 hodin při teplotě 4 °C. Po uplynutí této doby byly vzorky přeneseny do nových mikrozkupek. Následně byly plazmidy elektroporací zaklonovány do bakteriálních vektorů, viz kapitola 3.7.1., kde je popsána i další práce s bakteriemi.

3.8.6.4. Výběr vhodných kolonií

Kolonie bakterií, které se vytvořily na selekčním LB médiu, bylo následně nutné otestovat, zda obsahují hledanou sekvenci. To bylo provedeno pomocí PCR reakce s parametry odpovídajícími původní PCR reakci s danými vzorky s izolovanou DNA s tím rozdílem, že jako templát bylo použito bakterie z jednotlivých kolonií. Rozdělení PCR produktů a jejich vizualizace proběhly tak, jak bylo popsáno výše, v kapitole 3.8.4.

3.8.6.5. Izolace plazmidu a sekvenace

Úspěšně transformované kolonie byly přeočkovány do tekutého LB média s kanamycinem a kultivovány tak, jak bylo popsáno na konci kapitoly 3.7.1. Plazmidy byly následně izolovány pomocí kitu Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, USA, Madison, Woods Hollow Road 2800, 53711) podle protokolu výrobce. Izolované sekvenace byly zaslány na sekvenaci do Laboratoře Sekvenace DNA PŘF UK, Praha, Viničná 1594/7, 12800. Sekvenace byla provedena Sangerovou metodou v mikrokapiláře s využitím fluorescenčně značených dNTP.

3.9. Bioinformatické analýzy

Většina dat pro bioinformatické analýzy byla získána z knihoven přístupných přes webovou aplikaci BLAST® (BLAST, 2017) (z anglického Basic Local Alignment Search Tool), a to z knihoven „Nucleotide collection“, „Reference RNA sequences“, „Reference genomic sequences“ a „Expressed sequence tags“. Vyhledávání trehalázových sekvencí v těchto knihovnách bylo zprostředkováno též webovou aplikací BLAST® (2017).

Dále byla data získána z orchidejových genomových databází Orchidstra 1.0/2.0 (Su *et al.*, 2013; Chao *et al.*, 2017) a OrchidBase 2.0 (Tsai *et al.*, 2013) pomocí aplikace BLAST (Madden, 2013).

Mnohonásobný sekvenční alignment získaných sekvencí byl zpracován pomocí webové aplikace MAFFT verze 7 (Katoh & Standley, 2013). Takto vzniklý alignment byl dále manuálně upraven v aplikaci BioEdit verze 7.2.5 (Hall, 1999).

Rekonstrukce fylogeneze trehalázových genů a konstrukce fylogenetického stromu byla provedena v programu Mega verze 6.06 (Tamura *et al.*, 2013). Parametry rekonstrukce:

- 1) statistická metoda: Maximum Likelihood
- 2) test fylogeneze: Bootstrap, 1000 replikátů
- 3) substituční model: Tamura-3-parameter (Tamura, 1992)
- 4) site coverage cutoff: 85 %
- 5) Maximum Likelihood heuristická metoda: Nearest-Neighbor-Interchange
- 6) Filtr pro větvení: silný

3.10. Histochemické analýzy

3.10.1. Histolokalizace trehalázové aktivity

Histolokalizace trehalázové aktivity byla provedena metodou, která byla optimalizována naším týmem pro tyto účely (Ponert *et al.* in prep.). Trehalázová aktivita je zde po mírné fixaci řezů vizualizována modrým nerozpustným produktem formazanem. Ten vzniká ve sledu reakcí:

- 1) trehalóza \rightarrow 2 glukóza
- 2) $\text{glukóza} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{D-glukono-1,5-lakton} + \text{H}_2\text{O}_2$
- 3) $\text{D-glukono-1,5-lakton} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{oxidovaný PMS} \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{redukovaný PMS}$
- 4) $\text{redukovaný PMS} + \text{oxidovaný NBT} \rightarrow \text{oxidovaný PMS} + \text{redukovaný NBT (formazan)}$

První reakci katalyzuje enzym trehaláza, druhou reakci pak glukózaoxidáza.

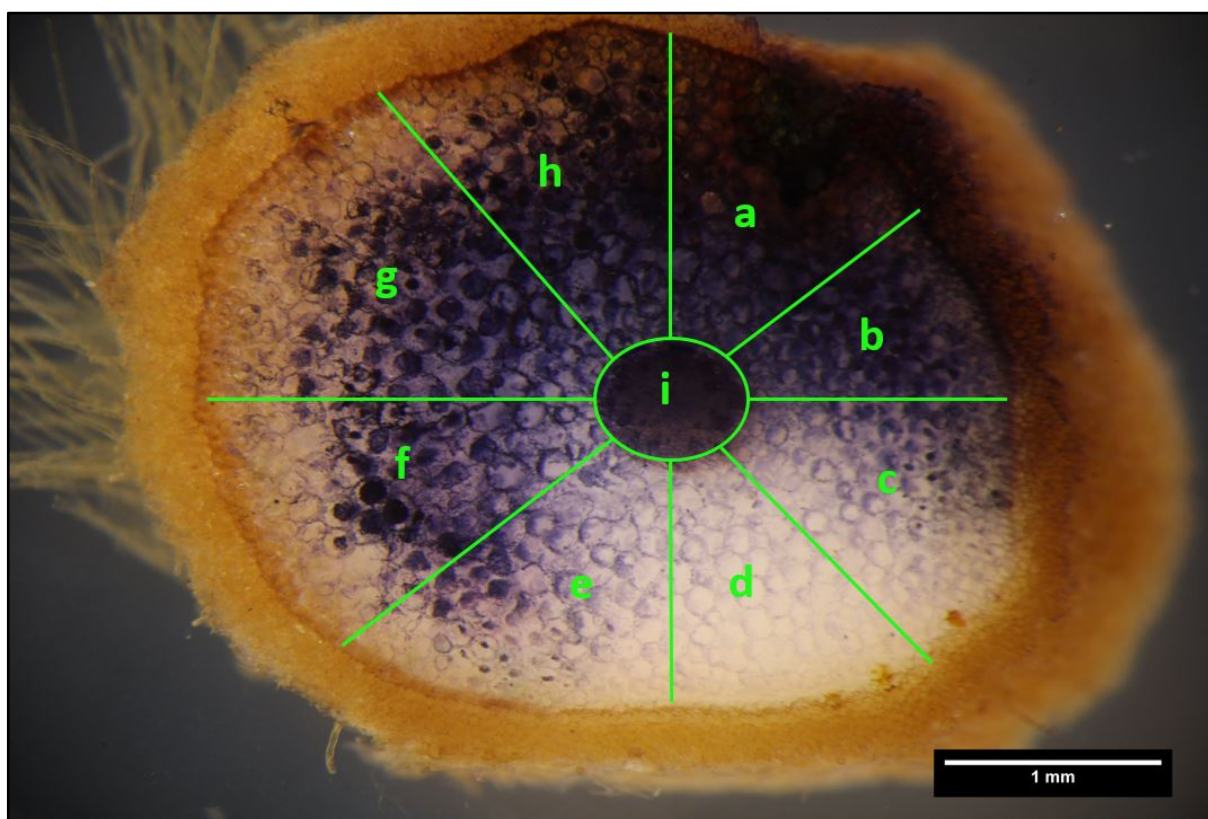
Jako materiál byly použity kořeny rostlin pěstovaných v hrnkové kultuře. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno tak, jak je popsáno v kapitole 3.10.2. Je nutné zdůraznit, že rozdělení kořene do popsaných oblastí může být značně subjektivní, přesto však představuje asi nejpřesnější možný přístup. Signál reprezentovaný barevným produktem není dostatečně přesný na úrovni buňky, a proto nebylo možné určovat aktivitu trehalázy na úrovni buněk. Navíc barvení probíhá nejlépe na relativně silných řezech a na takovýchto řezech je často obtížné rozlišit jednotlivé buňky, a zda signál nepochází z hlubších vrstev řezu.

Histochemické metody byly použity k lokalizaci trehalázové aktivity v mykorhizních kořenech dospělých rostlin orchidejí. Kořen rostliny byl nejprve odstřižen, důkladně omyt vodou, a co nejrychleji byl poté nařezán na relativně silné (přibližně 0,5 mm) příčné řezy žiletkou. Řezání probíhalo na plastové Petriho misce ve fixáži tak, aby řezné plochy byly okamžitě vystaveny fixáži. Složení, příprava a skladování fixáže, pufru a dalších roztoků použitých pro histochemické metody viz Příloha 1. Řezy byly poté přeneseny do vialky (P-lab) obsahující přibližně 2 ml fixáže. Po naplnění vialky řezy byla fixáž vyměněna za čerstvou, vialka zakryta parafilmem a skladována při 2 °C. Po 1 hodině od začátku fixace byla fixáž ve vialce vyměněna za pufr SoPo (z anglického Sodium Phosphate). Pufr byl poté ještě 3krát vyměněn za čerstvý, aby byla odmyta fixáž, vialka poté byla skladována při 2 °C a každou hodinu byl vyměněn pufr za čerstvý, a to alespoň 10krát před postupem k dalšímu kroku. Toto promývání slouží především k úplnému odmytí fixáže a také rozpustných sacharidů a dalších metabolitů.

Poté byla připravena reakční směs určená k barvení. Do 2 ml čisté mikrozkušavky bylo přeneseno 225 μ l roztoku DPI (diphenyleneiodonium chlorid), 225 μ l roztoku trehalózy, 450 μ l roztoku GOX (glukózaoxidáza), 450 μ l roztoku NBT (Nitro blue tatrazolium) a 450 μ l roztoku PMS (fenazin methosulfát). Z vialky obsahující řezy byla část řezů odebrána do nové čisté vialky, kdy tato sloužila jako negativní kontrola. Z první vialky byl odebrán pufr a tento byl nahrazen reakční směsí. Do druhé vialky byla přidána reakční směs, ve které byl roztok trehalózy nahrazen pufrem SoPo, a ve které tedy chyběl substrát enzymu, jehož aktivitu měla tato metoda vizualizovat. Vialky s řezy a reakční směsí byly uzavřeny parafilmem a rychle přeneseny na třepačku a inkubovány ve tmě, při 30 °C a frekvenci třepání 30 rpm. Vzorky pak byly pravidelně kontrolovány, zda již nedochází k barvení. Ve chvíli, kdy bylo barvení dostatečné (přibližně 20 minut), byla z vialek odebrána reakční směs a tato nahrazena 2 ml pufrem SoPo. Pufr byl poté vyměněn ještě alespoň 2krát za čerstvý, aby byla odmyta reakční směs, a nedocházelo tak nadále k barvení. Řezy byly poté pozorovány pod stereomikroskopem s instalovaným fotoaparátem. Od každé vialky bylo zdokumentováno alespoň 12 řezů. Od jednoho kořene byly zpravidla připraveny 2 vialky obsahující každá přibližně 50 řezů a jedna kontrolní, obsahující přibližně 15 řezů. Pozorování probíhalo na tenké vrstvě pevného agaru, v kapce pufrem SoPo a pod krycím sklíčkem.

3.10.2. Vyhodnocení histochemických analýz

Vyfotografované řezy byly vyhodnoceny tak, že v rámci řezu bylo určeno 9 oblastí buněk, které buďto obsahovaly, nebo neobsahovaly smotky hub; a buďto byly, nebo nebyly obarveny. Jedna z oblastí byl střední válec kořene, kde houby nebyly nikdy přítomny. Každá z dalších oblastí představovala nejvýše osminu plochy primární kůry. Pokud oblast měla charakter kombinovaný, např. byla obarvena, ale v celé ploše byl jeden nebo několik málo smotků, pak byla zařazena do kategorie, jíž byla nejbližší, zde jako bez smotků, obarvená. Příklad viz obrázek 3.3.



Obrázek 3.3. Vyhodnocení histolokalizace trehaláz. Příčný řez kořenem druhu *Paphiopedilum purpuratum*: a) oblast se smotky, obarvená; b) oblast se smotky, obarvená; c) oblast bez smotků, obarvená; d) oblast bez smotků; neobarvená e) oblast bez smotků, obarvená; f) oblast se smotky, obarvená; g) oblast se smotky, obarvená; h) oblast se smotky, obarvená; i) střední válec, oblast bez smotků, obarvená.

3.11. Statistická analýza

Statistické vyhodnocení experimentů probíhalo z převážné většiny v programu R (R Core team 2016) s použitím balíčků Rcmdr (Fox, 2016) a pgirmess (Giraudoux 2016, <https://cran.r-project.org/package=pgirmess>). Ve všech testech byla pro rozhodnutí o platnosti nulové hypotézy použita hladina významnosti $\alpha = 0,05$. Zda výběry byly realizací náhodné proměnné s normálním rozdělením, bylo testováno pomocí Shapirova-Wilkova testu (Shapiro & Wilk, 1965). V případě jednocestné analýzy rozptylu byl Shapirův-Wilkův test aplikován nikoliv na jednotlivé výběry, ale na standardizovaná rezidua. V případě potřeby byla testována homoskedasticita výběrů pomocí Bartlettova testu (Bartlett, 1952).

Data byla statisticky hodnocena těmito testy:

- 1) Wilcoxonův test (Wilcoxon, 1945)
 - pro porovnání dvou nezávislých výběrů při předpokladu zamítnutí normálního rozdělení výběrů
 - dále pod zkratkou WRS
- 2) Jednocestná analýza rozptylu - ANOVA (Welch, 1951) + *post hoc* porovnání skupin Tukeyho HSD (z anglického Honest Significance Difference) testem (Tukey, 1949).
 - pro porovnání více než dvou nezávislých výběrů
 - podmínka 1) normální rozdělení výběrů – při zamítnutí předpokladu použit Kruskalův-Wallisův test

- podmínka 2) homoskedasticita – při porušení předpokladu použít Welschův test
- dále pod zkratkou OWA
- 3) Kruskalův-Wallisův test (Kruskal & Wallis, 1952) + *post hoc* testování Kruskalovým Wallisovým testem mnohonásobného porovnání - příkazem `kruskalmc` (balíček `pgirmess`, Giraudoux 2016, <https://cran.r-project.org/package=pgirmess>)
- dále pod zkratkou KW
- 4) Welchův F-test (Welch, 1951)
- dále pod zkratkou WFT
- 5) Hierarchická analýza rozptylu + *post hoc* porovnání skupin Tukeyho HSD testem
- pro data s hierarchickým designem, provedena v programu Statistica (Statsoft cz s.r.o., Praha, Ringhofferova 115/1, 155 21)
- dále pod zkratkou NDA
- 6) Fisherův exaktní test (Fisher, 1922) s Yatesovou korekcí na spojitost (Yates, 1934)
- pro testování závislosti dvou kategoriálních proměnných s nízkými očekávanými četnostmi
- použít při vyhodnocování výsledků histochemických analýz
- dále pod zkratkou FTY

Testy porovnávající více skupin (Tukey HSD test, `kruskalmc`, viz výše) jsou dále značeny shodně jako MC test. Jejich výsledek je v tabulkách a grafech zaznamenán jako písmena od písmene **a** dále podle abecedy. Posloupnost písmen značí umístění výběrů podle míry polohy, kterou daný test používá, pokud se tyto signifikantně liší, a to od největší po nejmenší, tedy $a > b > c$ atd. Nejmenší počet pozorování pro statistické testování byl 3. Pokud je *p*-hodnota menší než 1×10^{-6} , pak je v tabulkách uvedena jen jako $< 1 \times 10^{-6}$. V případě, že je *p*-hodnota menší, než 0,05, tedy menší než zvolená hladina významnosti 0,05, je tato zvýrazněna červeným písmem.

3.12. Grafy a tabulky

Tabulky zahrnuté v této práci jsou dvojího typu, jednak jde o tabulky klasické, např. tabulky týkající se obsahu sacharidů, či velikosti protokormů. U těchto tabulek se vyskytuje několik zkratk. SD – směrodatná odchylka, *n* – počet objektů, *nd* – počet Petriho misek, test – použitý statistický test. V sloupci „varianta“ jsou uvedeny varianty médií: sacharóza – médium SMS se sacharózou (SMS), glukóza – médium SMS s glukózou (SMG), trehalóza – médium SMS s trehalózou (SMT), žádný – médium SMS bez přidaného sacharidu (SMK), trehalóza + validamycin – médium SMS s trehalózou a validamycinem A (SMTV).

V práci se také vyskytují čtyřpolní tabulky. Zde čísla v bílých buňkách udávají četnosti výskytu daných kombinací kategorií; čísla v modrých boxech udávají sumy četnosti výskytu kategorií.

Dále se v práci vyskytuje řada krabicových grafů, tzv. boxplotů. Ty byly vytvořeny v programu R a mají vlastnosti příkazu `boxplot`. Úsečka ve středu boxu značí medián odhadnutý z výběru, horní a dolní hrana boxu značí horní a dolní kvartil, tykadla značí minimum a maximum, pokud tato nejsou odlehlá.

Odlehlá pozorování jsou taková, jejichž hodnota je větší než $3/2$ mezikvartilového rozpětí. Na ose y je vynesena kvantitativní proměnná, na ose x kvalitativní proměnná.

Dalším typem grafu je graf použitý pro vizualizaci velikosti protokormů. Tento graf vizualizuje kromě rozdílu mezi variantami i rozdíly mezi Petriho miskami, a je tak vhodným vizuálním doprovodem k použité hierarchické analýze rozptylu. Zde chybové úsečky představují střední chybu průměru. Symboly uprostřed úseček znázorňují průměr. Jednotlivé úsečky představují jednotlivé Petriho misky a varianty média jsou odlišeny barvou úseček a symbolů a typem symbolu.

Dále byly použity sloupcové grafy. Na ose y jsou zde vyneseny hodnoty spojité proměnné, na ose x diskrétní proměnné. V jednom sloupci je vždy spojeno několik kategorií, kdy tyto jsou odlišeny barvami podle přiložené legendy. Čísla v boxech zde uvádějí příslušnou hodnotu, kterou daná část grafu reprezentuje.

3.13. Design experimentů

3.13.1. Utilizace trehalózy protokormy orchidejí

Tato experimentální část měla za úkol testovat hypotézu I: „Schopnost využít trehalózu je v rámci čeledi *Orchidaceae* ustálená“ a dosáhnout tak cíle: „Ověřit schopnost využít trehalózu vybraných druhů orchidejí“.

K adresování této hypotézy bylo založeno několik kultivačních experimentů. Byly vytvořeny asymbiotické kultury orchidejí (čeleď *Orchidaceae*) a rostlin orchidejím nejbližších, čeledi *Hypoxidaceae*. Do experimentu byly původně zahrnuty druhy ze všech pěti podčeledí čeledi *Orchidaceae* a také několik druhů z čeledi *Hypoxidaceae* (pro přehled a bližší taxonomické zařazení všech použitých druhů viz Příloha 2). Z fylogeneticky nejbazálnější podčeledi *Apostasioideae* byl zahrnut druh *Neuwiedia zollingerii* var. *javanica*. Semena tohoto druhu byla získána z jediných rostlin z podčeledi *Apostasioideae*, které byly kdy vypěstovány, a rostly tak mimo svá přirozená stanoviště. S tímto privilegiem se váže také absolutní absence informací o kultivačních nárocích rostlin z tohoto taxonu. Z podčeledi *Vanilloideae* bylo do experimentu původně plánováno zahrnout druh *Pogonia japonica*, avšak nepodařilo se sehnat semena tohoto druhu a ani žádného jiného druhu z této podčeledi. Komerčně dostupné tobolky vanilek *Vanilla planifolia*, *pompona* a *tahitiensis* procházejí fermentací, a proto neobsahují životaschopná semena, přičemž neošetřené tobolky nejsou dostupné (Ponert, pers. com., Praha, 2016). Z podčeledi *Cypripedioideae* byly zastoupeny druhy *Paphiopedilum barbatum* a *Paphiopedilum niveum*. Z podčeledi *Orchidoideae* byly zahrnuty tři druhy, a to druhy ze dvou důležitých vývojových linií tohoto taxonu – *Thelymitra nuda* (tribus *Diurideae*, subtribus *Thelymitrineae*), *Diuris magnifica* (tribus *Diurideae*, subtribus *Duiridineae*) a *Ludisia discolor* (tribus *Cranichideae*). Třetí důležitou linií je tribus *Orchideae*. Na druhu *Dactylorhiza majalis* z tohoto taxonu byly shodné experimenty naším týmem již provedeny (Ponert et al., in prep). Z podčeledi *Epidendroideae* byl zahrnut druh *Pleione maculata*. Pro uzavření fylogenetického rámce experimentu byly pěstovány také rostliny z čeledi *Hypoxidaceae* – *Hypoxis decumbens*, *Hypoxis*

hemerocallidea a *Pauridia capensis*. Rod *Hypoxis* a rod *Pauridia* představují zástupce dvou ze tří fylogenetický větví čeledi Hypoxidaceae (Kocyan *et al.*, 2011).

Výsevy byly provedeny na různé modifikace SMS média. SMS médium samotné bylo zvoleno z toho důvodu, že neobsahuje žádné složky, které by mohly obsahovat sacharidy nebo jiné zdroje uhlíku, případně růstové regulátory apod. (např. kokosové mléko, ananasová šťáva, kvasničný extrakt a další složky, které se při kultivaci orchidejí používají, Ponert *et al.*, 2011), a zároveň je vhodné pro kultivaci orchidejí (Ponert, 2009; Dostálová, 2016). Z modifikovaných variant SMS média se jednalo o variantu obsahující sacharózu (*de facto* tak šlo o standardní SMS médium), která v experimentu sloužila jako pozitivní kontrola. Sacharóza je totiž obecně u orchidejí považována za vhodný zdroj uhlíku a energie pro jejich růst a vývoj v asymbiotických kulturách (Knudson, 1922; Jheng *et al.*, 2006; Stewart & Kane, 2010) a zároveň představuje jeden z hlavních rozpustných endogenních sacharidů orchidejí (Ponert & Lipavská, 2017). Jako druhá pozitivní kontrola sloužila SMG modifikace média SMS, obsahující na místo standardní sacharózy glukózu, kterou jsou orchideje zpravidla též schopny využít (Knudson, 1924; Ernst *et al.*, 1971). Jako negativní kontrola sloužila varianta SMS média bez přidaných sacharidů (SMK). Experimentální varianta SMT byla modifikována nahrazením sacharózy trehalózou, jež byla také opakovaně úspěšně použita při kultivaci orchidejí (např. Ernst *et al.*, 1971; Smith, 1973; Liu *et al.*, 2006). Koncentrace sacharidů byly 50 mM v SMS a SMT médiích, a 100 mM v SMG médiu. Koncentrace se liší kvůli tomu, že glukóza je na rozdíl od sacharózy a trehalózy monosacharid, a bylo jí tedy nutné dodat dvojnásobek. Kultivace probíhala u všech rostlin ve tmě, v uzavřených plastových boxech. Doba kultivace se řídila vývojem protokormů; nejkratší doba kultivace byla u druhu *Ludisia discolor* (přibližně 2 měsíce) a nejdelší u druhu *Paphiopedilum barbatum* (přibližně 8,5 měsíce), nepočítaje druhy z čeledi Hypoxidaceae. Od každé varianty každého druhu bylo vyseto nejméně šest Petriho misek, na každou misku připadalo zpravidla několik set semen. Pro vyšší sílu statistických testů by byly vhodné vyšší počty misek, limit ovšem představovalo množství dostupných semen. Konkrétnější parametry kultivace viz kapitola 3.6. a Příloha 2.

Pro hodnocení schopnosti rostlin růst a vyvíjet se na různých variantách média byly použity tyto parametry: klíčivost, úmrtnost, velikost, relativní obsah vody (RWC), obsah endogenních rozpustných sacharidů a škrobu v protokormech a obsah sacharidů v médiu po kultivaci.

3.13.2. Histolokalizace trehalázové aktivity

Tato experimentální část měla za úkol testovat hypotézu II: „Vznik mykorhizy stimuluje u orchidejí trehalázovou aktivitu“ a dosáhnout tak cíle „Zjistit, zda může vznik mykorhizy u orchidejí stimulovat trehalázovou aktivitu“.

K adresování této hypotézy byl do práce zařazen experiment pracující s histochemickými metodami umožňujícími vizualizovat trehalázovou aktivitu. U orchideje *Dactylorhiza majalis* z podčeledi Orchidoideae bylo naším týmem již potvrzeno, že v mykorhizních částech kořenů je výrazná trehalázová aktivita přítomna (Ponert *et al.*, in prep.). V této práci proto byly testovány druhy z dalších vývojových větví podčeledi

Orchidoideae a druhy z dalších podčeledí čeledi Orchidaceae. Nebylo však možné získat mykorhizní kořeny všech druhů zahrnutých do kultivačních pokusů, ač by takovéto uspořádání bylo nejkoherentnější. Zařazen byl druh *Paphiopedilum purpuratum*, tedy druh blízce příbuzný druhům *P. niveum* a *P. barbatum*, reprezentoval zde podčeď Cypripedioideae. Za podčeď Orchidoideae byl zařazen druh *Ludisia discolor*, který je zařazen i do kultivačních pokusů. Z této podčeledi byl zařazen ještě druh *Disa tripetaloides*, reprezentující zde subtribus Diseae, tedy jinou vývojovou větev v rámci tribu Orchideae, než do které patří *D. majalis* (Chase *et al.*, 2016).

3.13.3. Sekvenace trehalázových genů

Tato experimentální část měla za úkol zejména dosáhnout cíle: „Získat sekvence trehalázy u zástupců všech podčeledí čeledi Orchidaceae“, a zlepšit tak testování hypotézy III: „K multiplikaci trehalázových genů došlo v rámci čeledi Orchidaceae pouze v podčeledi Orchidoideae“, a IV: „Multiplikace trehalázových genů u orchidejí není v rámci podříše Embryophyta ojedinělá“.

Tento experiment byl tedy zaměřen na izolaci sekvencí trehalázových genů z genomové DNA vybraných druhů. Druhy zvolené pro tento experiment (DNA1) byly proto vybrány tak, aby co nejlépe pokryly důležité vývojové linie čeledi Orchidaceae. Dále pak bylo zařazeno několik druhů z blízce příbuzných čeledí čeledi Orchidaceae – čeledí Hypoxidaceae, Blandfordiaceae a Lanariaceae. Celkově bylo do experimentu zařazeno 17 druhů rostlin (viz Příloha 2).

3.13.4. Fylogeneze trehalázových genů

Tato experimentální část měla za úkol zejména adresovat hypotézu III. „K multiplikaci trehalázových genů došlo v rámci čeledi Orchidaceae pouze v podčeledi Orchidoideae“ a hypotézu IV: „Multiplikace trehalázových genů u orchidejí není v rámci podříše Embryophyta ojedinělá“. Tato experimentální část měla také za úkol dosáhnout cíle: „Rekonstruovat fylogenezi trehalázových genů v rámci podříše Embryophyta z dostupných a získaných databází“ a dále cíle: „Získat sekvence trehalázy u zástupců všech podčeledí čeledi Orchidaceae“.

Tento experiment tedy zahrnoval prohledání dostupných databází, sekvenční alignment získaných a sekvencí nalezených v databázích a konstrukci fylogenetického stromu.

4. Výsledky

4.1. Utilizace trehalózy protokormy orchidejí

Následující podkapitoly se budou věnovat jednotlivým kultivovaným druhům, u každého druhu budou uvedeny všechny sledované parametry. Takovéto uspořádání bylo zvoleno z toho důvodu, aby byl pohled na situaci v rámci druhu celistvý.

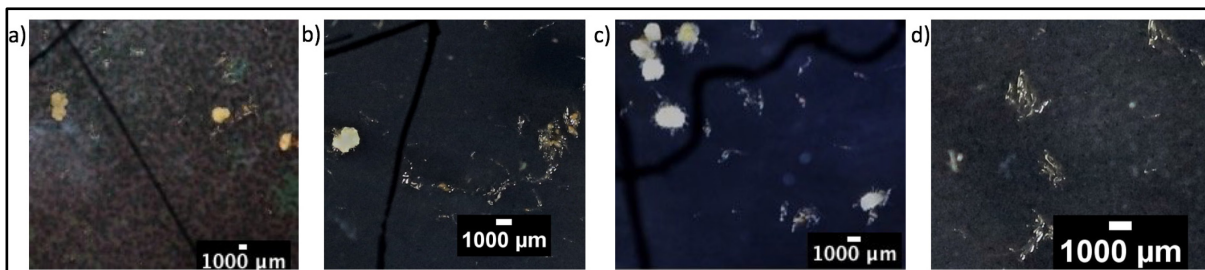
4.1.1. *Neuwiedia zollingerii*

První výsev semen tohoto druhu se nezdařil. Klíčivost semen byla nulová, a tak bylo přistoupeno k jinému způsobu výsevu. Na rozdíl od prvního výsevu, kde byla semena vyseta ve zralém stavu, byly ve druhém výsevu použita semena z nezralých semeníků. Tato semena se ovšem také nevyklíčila a další semena nebyla v průběhu tvorby této práce dostupná.

4.1.2. *Paphiopedilum barbatum*

Množství semen pro výsev tohoto druhu bylo poměrně omezené a klíčivost semen poměrně nízká. Z toho důvodu byla z tohoto experimentu získána jen dokumentace klíčivosti, úmrtnosti a velikosti a materiál

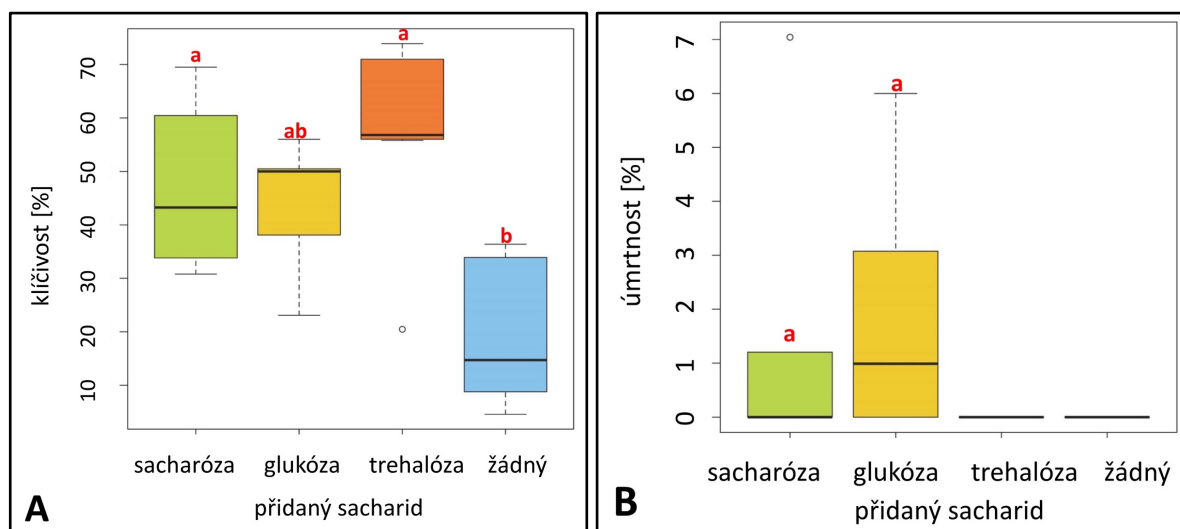
na izolaci RNA. Fotografie protokormů viz obrázek 4.1.



Obrázek 4.1. Protokormy *P. barbatum* po necelých 8,5 měsících kultivace na médiu SMS se sacharózou (a), glukózou (b), trehalózou (c), a bez přidání sacharidů (d).

4.1.2.1. Klíčivost a úmrtnost *P. barbatum*

Klíčivost semen tohoto druhu se statisticky významně lišila mezi variantami média (graf 4.1., tabulka 4.1.). Nejvyšší míra klíčivosti byla na médiu trehalózovém a sacharózovém, naopak nejnižší na médiu kontrolním (kontrola). Úmrtnost byla nulová na trehalózovém a kontrolním médiu (graf 4.1, tabulka 4.2.). Jelikož nulové hodnoty nejsou vhodné pro statistické testy pracující s kvantitativní proměnnou, nebyly tyto varianty do testu zařazeny. Je ovšem zřejmé, že úmrtnost na těchto médiích byla menší, než na sacharózovém a glukózovém médiu, která v tomto parametru nebyla statisticky odlišná.



Graf 4.1. Vliv různých sacharidů na klíčivost (A) a úmrtnost (B) druhu *P. barbatum* kultivovaných po dobu přibližně 8,5 měsíce na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaného sacharidu. Písmena nad boxploty značí výsledek testu mnohonásobného porovnání (MC test). Data a statistika viz tabulka 4.1. a 4.2.

varianta	průměr	SD	N	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	46,8	15,2	6	OWA	0,0015	a
glukóza	43,5	13,2	5			ab
trehalóza	57,9	18,3	6			a
žádný	20,1	14	7			b

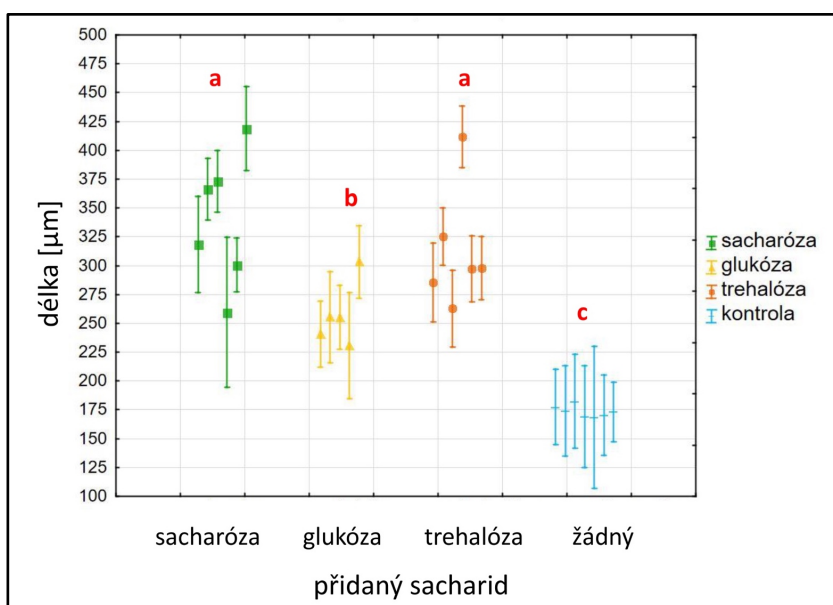
Tabulka 4.1. Klíčivost druhu *P. barbatum* na médiu SMS s různými sacharidy (varianta) v procentech. SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, OWA – jednocestná ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

varianta	průměr	SD	N	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	1,4	2,8	6	WRS	0,062	-
glukóza	2	2,6	5			-
trehalóza	0	0	6	-	-	-
žádný	0	0	7			-

Tabulka 4.2. Úmrtnost druhu *P. barbatum* na médiu SMS s různými sacharidy (varianta) v procentech. SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, WRS – Wilcoxonův test, hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

4.1.2.2. Velikost protokormů *P. barbatum*

Velikost protokormů tohoto druhu (obrázek 4.1.) se mezi variantami média statisticky významně lišila (graf 4.2., tabulka 4.3.), ovšem p-hodnota jen velmi těsně překročila zvolenou hladinu významnosti 5 %. Největší byly protokormy na médiu SMS a SMT, středně velké na médiu SMG a nejmenší na médiu SMK. Je patrné, že za většinu meziskupinové variability je zodpovědný rozdíl varianta kontrolní od variant se sacharidy. Tento trend se opakuje u všech následujících druhů, většinou ve výrazně významnější míře než u tohoto druhu. Ačkoliv jsou rozdíly mezi variantami statisticky významné, je z grafu 4.2. dobře patrné, že vnitroskupinová variabilita je poměrně velká. To je patrné důvodem, proč z celkové variability velikosti protokormů bylo modelem vysvětleno pouze 8 % (což je výrazně méně, než u dalších pozorovaných druhů); přibližně 1 % vysvětlila proměnná Petriho miska.



Graf 4.2. Vliv různých sacharidů na maximální průměr protokormů *P. barbatum* kultivovaných po dobu přibližně 8,5 měsíce na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaného sacharidu. Chybové úsečky představují střední chybu průměru, symboly uprostřed úseček znázorňují průměr, jednotlivé úsečky pak představují jednotlivé Petriho misky a varianty média jsou odlišeny barvou úseček a symbolů a typem symbolu. Písmena nad úsečkami značí výsledek testu mnohonásobného porovnání (MC test). Data a statistika viz tabulka 4.3.

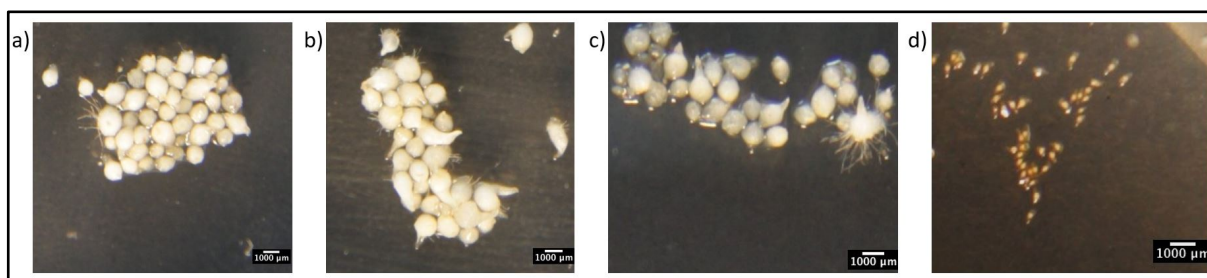
varianta	průměr	SD	N	nd	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	346,1	277,7	446	6	NDA	0,049	a
glukóza	259,4	297,7	335	5			b
trehalóza	319,8	330,4	525	6			a
žádný	173,9	38,7	380	7			c

Tabulka 4.3. Maximální průměr protokormů druhu *P. barbatum* v μm na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, nd – počet Petriho misek, NDA – hierarchická ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$

4.1.3. *Paphiopedilum niveum*

Výsev tohoto druhu se zdařil, a byly tak odebrány vzorky pro všechny plánované analýzy.

V rámci hodnocených parametrů se u tohoto druhu lišily varianty médií téměř vždy. Je tedy zřejmé, že vliv sacharidů na vývoj tohoto druhu je velice významný. Fotografie protokormů viz obrázek 4.2.

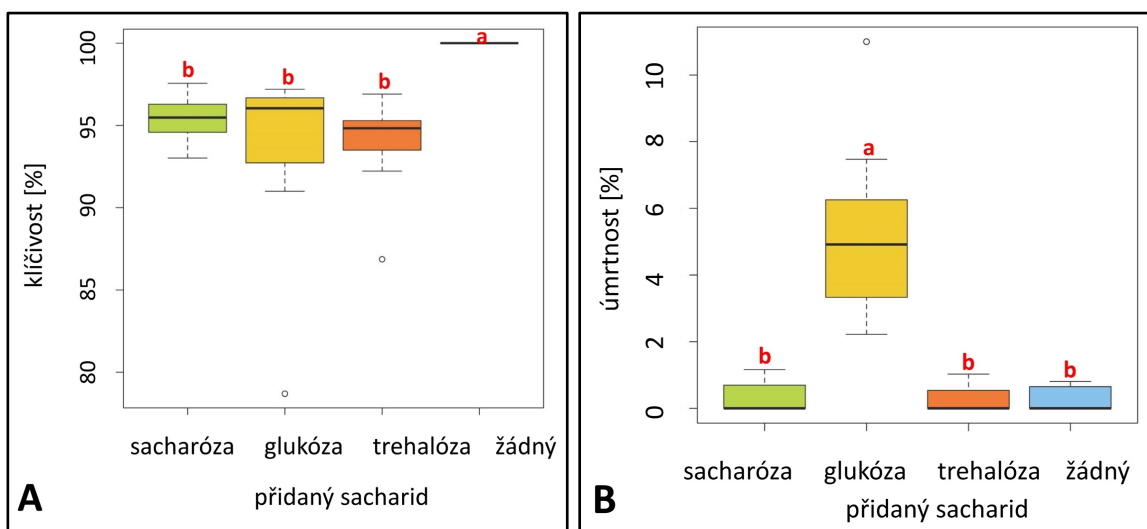


Obrázek 4.2. Protokormy *P. niveum* po přibližně 5 měsících kultivace na médiu SMS se sacharózou (a), glukózou (b), trehalózou (c), a bez přidaných sacharidů (d).

4.1.3.1. Klíčivost a úmrtnost *P. niveum*

Klíčivost u tohoto druhu byla velice vysoká, na kontrolním médiu vyklíčila dokonce všechna pozorovaná semena. Oproti kontrolnímu médiu byla statisticky významně nižší klíčivost na médiích obsahujících sacharidy, i zde ovšem byla klíčivost vysoká. Naproti tomu úmrtnost byla velice nízká u všech variant.

Oproti ostatním variantám byla výrazně a statisticky průkazně vyšší (cca 15krát) úmrtnost na médiu SMG. Výsledky viz graf 4.3. a tabulka 4.4. a 4.5.



Graf 4.3. Vliv různých sacharidů na klíčivost (A) a úmrtnost (B) druhu *P. niveum* kultivovaných po dobu přibližně 5 měsíců na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaného sacharidu. Písmena nad boxploty značí výsledek testu mnohonásobného porovnání (MC test). Data a statistika viz tabulka 4.4. a 4.5.

varianta	průměr	SD	n	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	95,4	1,6	7	KW	0,0011	b
glukóza	93,0	6,6	7			b
trehalóza	93,7	3,3	7			b
žádný	100	0	7			a

Tabulka 4.4. Klíčivost druhu *P. niveum* v procentech na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, KW – Kruskalův-Wallisův test následovaný KW-MC testem mnohonásobného porovnání (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

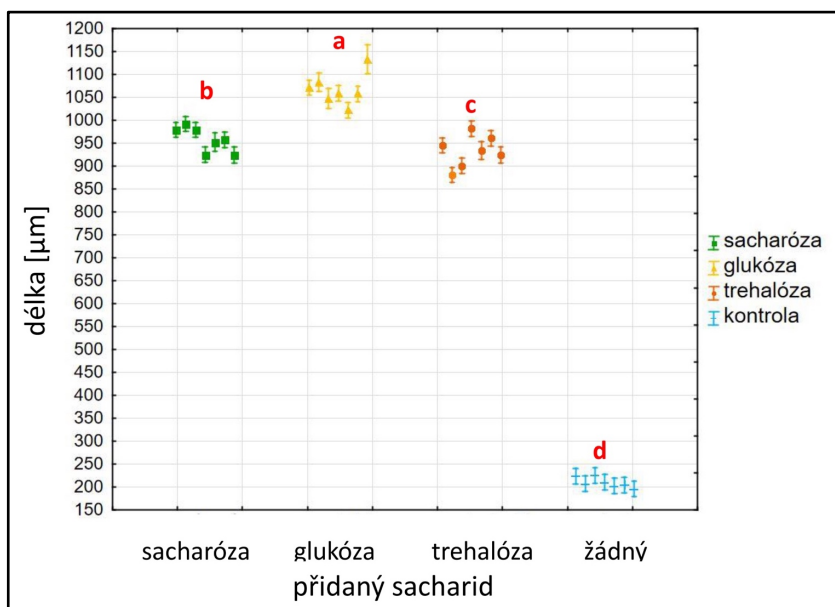
varianta	průměr	SD	n	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	0,4	0,5	7	KW	0,00088	b
glukóza	5,3	3,1	7			a
trehalóza	0,3	0,4	7			b
žádný	0,3	0,4	7			b

Tabulka 4.5. Úmrtnost druhu *P. niveum* v procentech na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, KW – Kruskalův-Wallisův test následovaný KW-testem mnohonásobného porovnání (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

4.1.3.2. Velikost protokormů *P. niveum*

Velikost protokormů tohoto druhu (obrázek 4.2.) se mezi variantami médií statisticky velmi významně lišila. Nejvýraznější rozdíl byl mezi variantami média obsahujícími sacharidy a médiem SMK. I mezi variantami média se sacharidy jsou ovšem statisticky průkazné rozdíly. Největší protokormy vyrostly na médiu SMG,

průkazně menší na médiu SMS a oproti SMS médiu byly průkazně menší protokormy na médiu SMT. Data jsou vizualizována v grafu 4.4. a zaznamenána v tabulce 4.6. V grafu 4.4. je patrné, že v rámci variant je velice malá variabilita mezi Petriho miskami a v rámci misek je také velice malá variabilita (ačkoliv je tento vjem částečně dán i rozpětím hodnot na ose y). Z celkové variability (vyjádřené rozptylem) bylo vysvětleno variantou média přibližně 85 %, proměnná miska vysvětluje jen zanedbatelnou část variability, a nevysvětleno tak zůstalo pouze kolem 15 % variability.



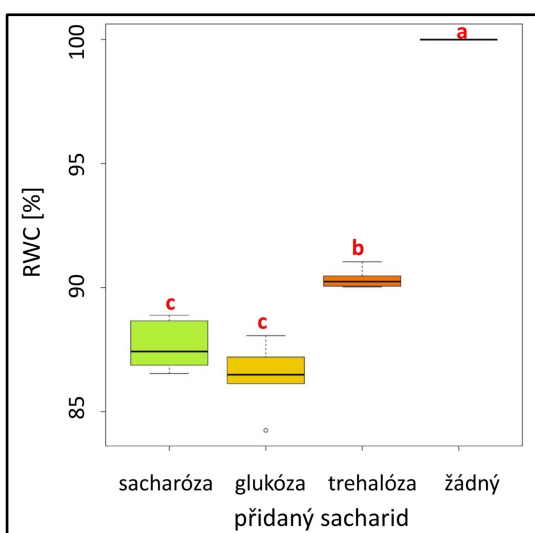
Graf 4.4. Vliv různých sacharidů na maximální průměr protokormů *P. niveum* kultivovaných po dobu přibližně 5 měsíců na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaného sacharidu. Chybové úsečky představují střední chybu průměru, symboly uprostřed úseček znázorňují průměr, jednotlivé úsečky pak představují jednotlivé Petriho misky a varianty média jsou odlišeny barvou úseček a symbolů a typem symbolu. Písmena nad úsečkami značí výsledek testu mnohonásobného porovnání (MC test). Data a statistika viz tabulka 4.3.

varianta	průměr	SD	N	nd	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	959,9	190,4	715	7	NDA	0,00017	b
glukóza	1059,7	221,6	595	7			a
trehalóza	932	189,4	738	7			c
žádný	209,6	44	725	7			d

Tabulka 4.6. Maximální průměr protokormů *P. niveum* v μm na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, nd – počet Petriho misek, NDA – hierarchická ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$

4.1.3.3. Relativní obsah vody *P. niveum*

Relativní obsah vody protokormů se u tohoto druhu statisticky velmi významně lišil mezi variantami média. Nejvyšší RWC byl zaznamenán u kontrolní varianty, průkazně menší pak na médiu SMT. Nejmenší a vzájemně srovnatelný byl RWC u protokormů na médiích SMS a SMG. Vizualizace dat je provedena v grafu 4.5. a záznam dat je uveden v tabulce 4.7.



Graf 4.5. Vliv různých sacharidů na relativní obsah vody (RWC) protokormů druhu *P. niveum* kultivovaných po dobu přibližně 5 měsíců na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaného sacharidu. Písmena nad boxploty značí výsledek testu mnohonásobného porovnání (MC test). Data a statistika viz tabulka 4.7.

varianta	průměr	SD	n	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	87,7	1,1	5	WFT	$<1 \times 10^{-6}$	c
glukóza	86,4	1,4	5			c
trehalóza	90,4	0,4	5			b
žádný	100	0	4			a

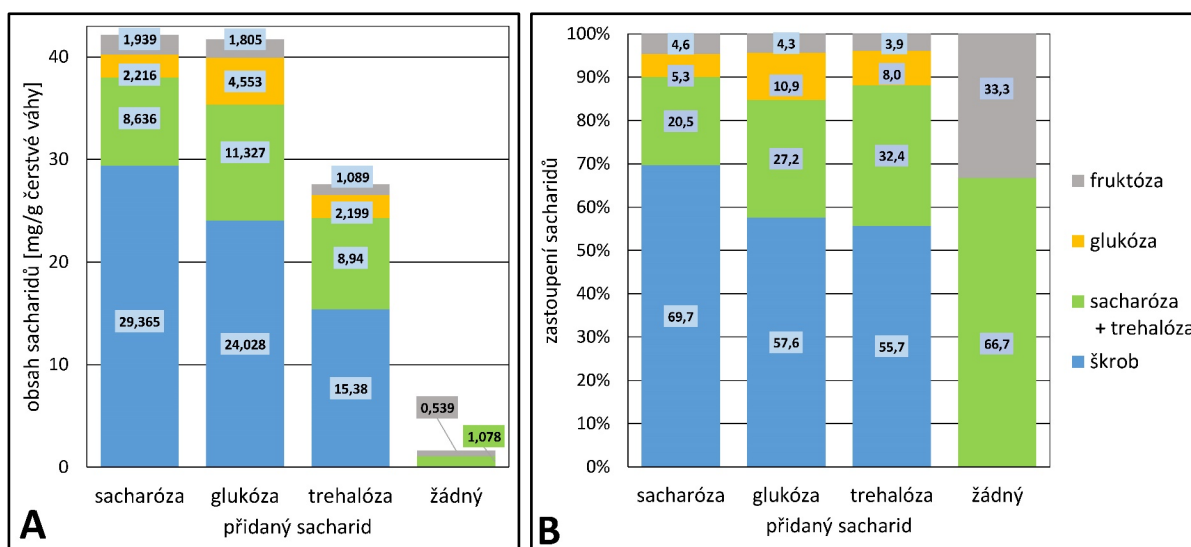
Tabulka 4.7. Relativní obsah vody protokormů druhu *P. niveum* v procentech na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, WFT – Welchův F-test následovaný Tukeyho HSD testem (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

4.1.3.4. Obsah rozpustných sacharidů a škrobu *P. niveum*

Obsah rozpustných sacharidů (dále cukrů) byl u protokormů *P. niveum* statisticky velice významně odlišný mezi variantami. Nejnížší obsah cukrů byl v protokormech vypěstovaných na médiu bez sacharidů. Nejvíce cukrů naopak bylo v protokormech z média SMG. Srovnatelný obsah cukrů byl na médiích SMT a SMS, kdy tento byl výrazně větší než na SMK a menší než na SMG. Mezi variantami se lišily obsahy všech dílčích změřených cukrů. Kromě fruktózy obsahuje nejméně všech dílčích cukrů kontrolní varianta, což odpovídá nejnížšímu celkovému obsahu sacharidů u této varianty. Naopak nejvíce dílčích sacharidů s výjimkou fruktózy obsahuje varianta SMG. Statisticky významný byl mezi variantami i rozdíl v obsahu škrobu. Patrně kvůli malému počtu pozorování, který negativně ovlivnil sílu testu, nebyl prokázán MC

testem rozdíl mezi variantami. Situace ovšem vypadá tak, že více škrobu je spíše na médiích SMG a SMS a méně na SMT. Ze statistické analýzy obsahu škrobu byla vyřazena varianta SMK, protože se u ní podařilo změřit jen dva vzorky, a to ještě nepřesně. Statisticky významný rozdíl je i v celkovém obsahu sacharidů (cukry plus škrob). Statisticky významný je i rozdíl mezi variantami v poměru cukry : škrob.

Na všech variantách bylo méně rozpustných sacharidů než škrobu. Data jsou vizualizována v grafu 4.6. a zaznamenána v tabulce 4.8.



Graf 4.6. Vliv různých sacharidů na obsah (A) a zastoupení (B) endogenních sacharidů v protokormech druhu *P. niveum* kultivovaných po dobu přibližně 5 měsíců na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaného sacharidu. Čísla v boxech představují průměr obsahu daného sacharidu v protokormech na dané variantě média (A), a procento, které daný sacharid představuje z celkového obsahu sacharidů v protokormech na dané variantě média (B). Data a statistika viz tabulka 4.8.

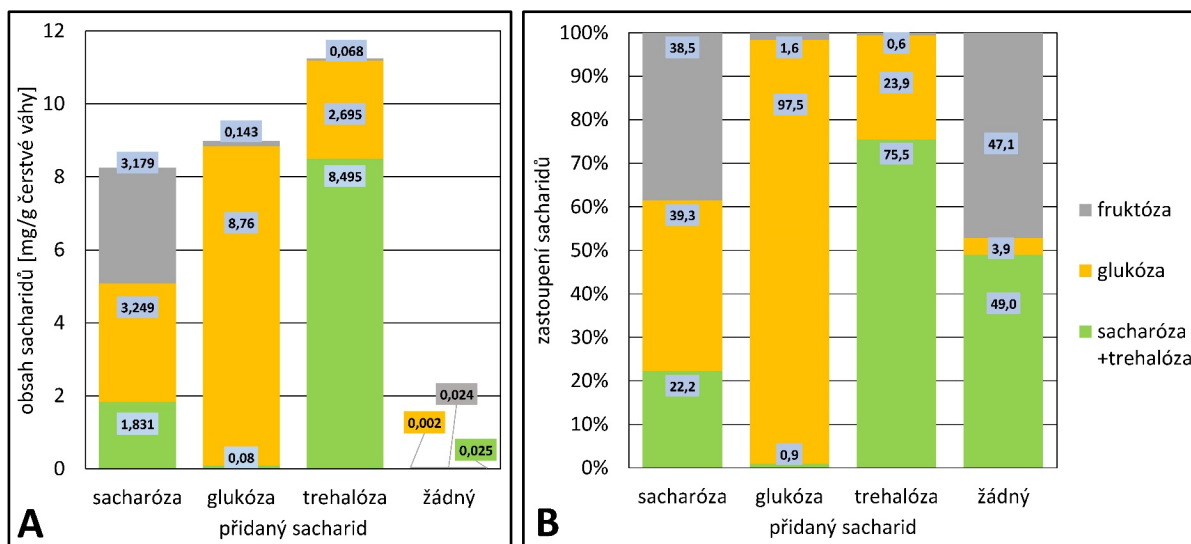
sacharid	varianta	průměr	SD	n	test	p-hodnota	MC test
sacharóza + trehalóza	sacharóza	8,636	0,686	5	OWA	<1 × 10 ⁻⁶	b
	glukóza	11,327	1,403	5			a
	trehalóza	8,94	0,952	5			b
	žádný	1,078	0,696	3			c
glukóza	sacharóza	2,216	0,557	5	OWA	0,00004	b
	glukóza	4,553	0,785	5			a
	trehalóza	2,199	0,345	5			b
	žádný	0,932	0,363	3			c

fruktóza	sacharóza	1,939	0,342	5	OWA	0,00015	a
	glukóza	1,805	0,281	5			a
	trehalóza	1,089	0,254	5			b
	žádný	0,539	0,064	3			b
škrob	sacharóza	29,365	25,909	5	KW	0,036	a
	glukóza	24,028	6,311	4			a
	trehalóza	15,38	1,269	5			a
	žádný	499,082	106,107	2	-	-	-
rozpuštěné	sacharóza	12,791	1,28	5	OWA	<1 × 10 ⁻⁶	b
	glukóza	17,685	2,282	5			a
	trehalóza	12,227	1,503	5			b
	žádný	2,55	1,564	3			c
rozpuštěné + škrob	sacharóza	36,283	26,587	5	KW	0,046	a
	glukóza	41,713	7,2	5			a
	trehalóza	27,607	2,677	5			a
	žádný	335,271	-	2	-	-	-
rozpuštěné : škrob (%)	sacharóza	60,2	35,594	5	KW	0,26	a
	glukóza	76,62	16,422	5			a
	trehalóza	79,351	5,408	5			a
	žádný	0,569	-	2	-	-	-

Tabulka 4.8. Obsah sacharidů (sacharid) v mg/g čerstvé váhy a poměr rozpustných sacharidů a škrobu v protokormech druhu *P. niveum* v procentech na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, OWA – jednocestná ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem (MC test), KW – Kruskalův-Wallisův test následovaný KW-testem mnohonásobného porovnání (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

4.1.3.5. Obsah sacharidů v médiu *P. niveum*

Obsah sacharidů v médiu nebyl statisticky hodnocen. Ve všech variantách média byly naměřeny i sacharidy, které do média přidány nebyly. Nejméně sacharidů bylo v médiu SMK, v ostatních médiích byl obsah sacharidů podstatně vyšší. V médiu SMS bylo naměřeno relativně velké množství fruktózy a glukózy. V médiu SMG byly naměřeny jen stopy fruktózy a sacharózy s trehalózou, výrazně zde převažovala glukóza. V médiu SMT byla naměřena kromě sacharózy a trehalózy také glukóza a velmi malé množství fruktózy. Malé množství všech cukrů bylo naměřeno i na médiu SMK. Výsledky jsou vizualizovány v grafu 4.7. a zaznamenány v tabulce 4.9.



Graf 4.7. Obsah (A) a zastoupení (B) sacharidů v médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaných sacharidů po přibližně 5 měsících kultivace protokormů druhu *P. niveum*. Čísla v boxech představují průměr obsahu daného sacharidu v daném médiu (A), a procento, které daný sacharid představuje z celkového obsahu sacharidů v daném médiu (B). Data viz tabulka 4.9.

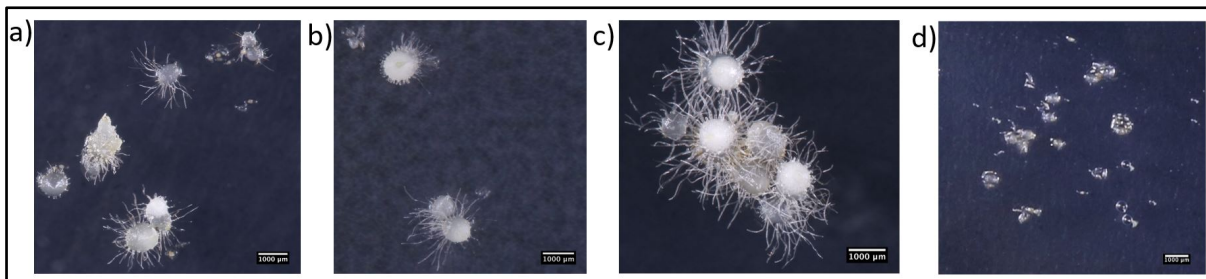
sacharid	varianta	průměr	SD	n
sacharóza + trehalóza	sacharóza	1,831	0,823	3
	glukóza	0,08	0,018	3
	trehalóza	8,495	1,303	3
	žádný	0,025	0,035	3
glukóza	sacharóza	3,249	0,402	3
	glukóza	8,76	0,386	3
	trehalóza	2,695	0,45	3
	žádný	0,002	0,003	3
fruktóza	sacharóza	3,179	0,409	3
	glukóza	0,143	0,124	3
	trehalóza	0,068	0,025	3
	žádný	0,024	0,011	3

Tabulka 4.9. Obsah sacharidů (sacharid) v médiu SMS s různými přidanými sacharidy (varianta) po kultivaci protokormů druhu *P. niveum* v mg/g čerstvé váhy. SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů

4.1.4. *Thelymitra nuda*

Výsev tohoto druhu byl úspěšný a byl odebrán materiál pro všechny plánované analýzy.

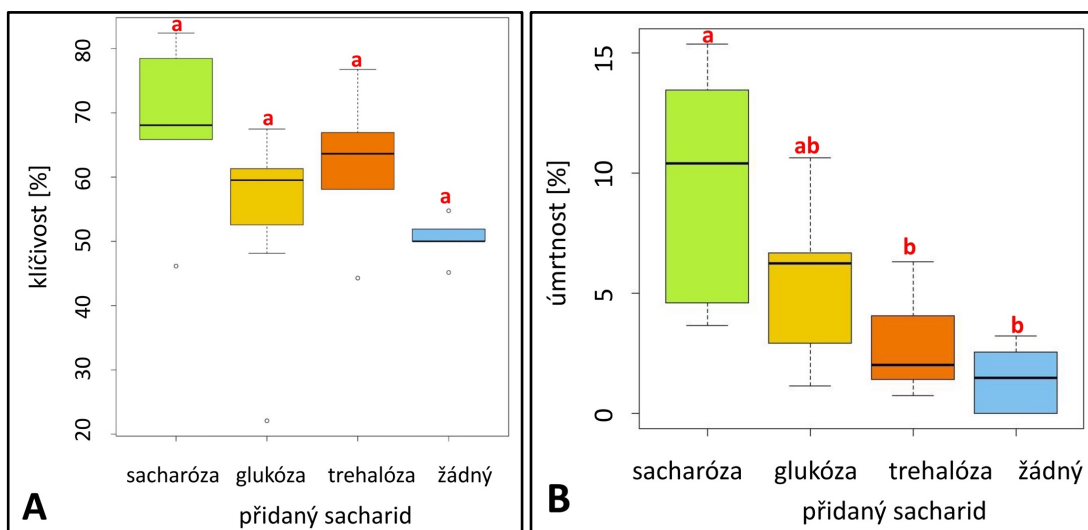
Fotografie protokormů tohoto druhu pěstovaných na jednotlivých variantách média viz obrázek 4.3.



Obrázek 4.3. Protokormy druhu *Thelymitra nuda* po necelých 4 měsících kultivace na médiu SMS se sacharózou (a), glukózou (b), trehalózou (c), a bez přidaných sacharidů (d).

4.1.4.1. Klíčivost a úmrtnost *T. Nuda*

Semena tohoto druhu klíčila na všech médiích obdobně. Vyšší klíčivost byla pozorována na médiích se sacharózou a trehalózou, rozdíl mezi variantami ovšem nebyl statisticky významný. Mezi variantami byl ovšem nalezen statisticky významný rozdíl v úmrtnosti. Nejvyšší úmrtnost byla na médiu SMS, srovnatelná byla média SMG a SMT, a nejnižší úmrtnost byla na médiu SMK. Na médiu SMS byla také nejvyšší klíčivost (neprůkazně) i úmrtnost protokormů. Vizualizace dat je provedena v grafu 4.8. a záznam dat uveden v tabulkách 4.10. a 4.11.



Graf 4.8. Vliv různých sacharidů na klíčivost (A) a úmrtnost (B) druhu *T. nuda* kultivovaných po dobu necelých 4 měsíců na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaného sacharidu. Písmena nad boxploty značí výsledek testu mnohonásobného porovnání (MC test). Data a statistika viz tabulka 4.10. a 4.11.

varianta	průměr	SD	n	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	68,2	14,1	5	KW	0,1	a
glukóza	53,8	15,2	7			a
trehalóza	66,3	7,8	5			a
žádný	50,4	3,5	5			a

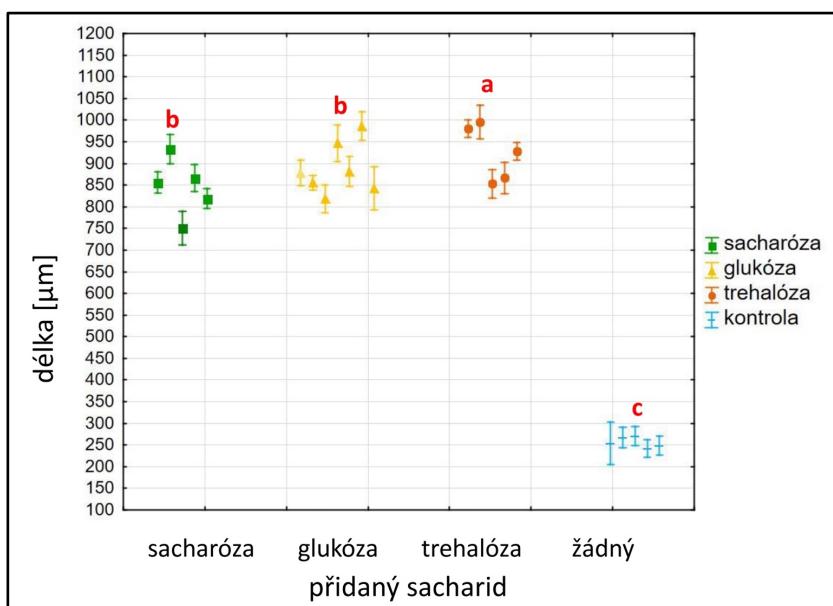
Tabulka 4.10. Klíčivost druhu *T. nuda* v procentech na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, KW – Kruskalův-Wallisův test následovaný KW-MC testem mnohonásobného porovnání, hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

varianta	průměr	SD	n	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	9,5	5,2	5	KW	0,03	a
glukóza	5,3	3,4	7			ab
trehalóza	3,3	2,4	5			ab
žádný	1,4	1,5	5			b

Tabulka 4.11. Úmrtnost druhu *T. nuda* v procentech na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, KW – Kruskalův-Wallisův test následovaný KW-MC testem mnohonásobného porovnání, hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

4.1.4.2. Velikost protokormů *T. nuda*

Protokormy tohoto druhu se mezi variantami statisticky významně lišily. Test mnohonásobného porovnání ukázal, že největší protokormy rostly na trehalóze (médiu SMT), statisticky významně menší byly protokormy na sacharóze a glukóze a výrazně nejmenší na médiu bez přidaných sacharidů, SMK. Výsledky viz graf 4.9. a tabulka 4.12. Variance velikosti protokormů byla u tohoto druhu vysvětlena téměř z 80 % variantami média, přibližně 2 procenty Petriho miskami a z necelých 20 % neznámými efekty.



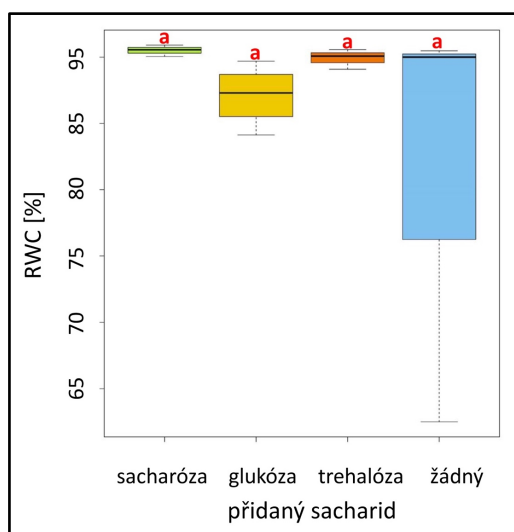
Graf 4.9. Vliv různých sacharidů na maximální průměr protokormů *T. nuda* kultivovaných po dobu necelých 4 měsíců na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaného sacharidu. Chybové úsečky představují střední chybu průměru, symboly uprostřed úseček znázorňují průměr, jednotlivé úsečky pak představují jednotlivé Petriho misky a varianty média jsou odlišeny barvou úseček a symbolů a typem symbolu. Písmena nad úsečkami značí výsledek testu mnohonásobného porovnání (MC test). Data a statistika viz tabulka 4.12.

varianta	průměr	SD	n	nd	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	846,1	188,6	185	5	NDA	0,00004	b
glukóza	876,7	177,6	255	7			b
trehalóza	936,3	240,4	221	5			a
žádný	258,6	91,09	268	5			c

Tabulka 4.12. Maximální průměr protokormů druhu *T. nuda* v μm na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, nd – počet Petriho misek, NDA – hierarchická ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

4.1.4.3. Relativní obsah vody *T. nuda*

Relativní obsah vody se u protokormů druhu *T. nuda* mezi variantami na hladině významnosti 5 % neodlišoval. Mírně nižší RWC bylo u protokormů na médiích SMG a SMK. Vizualizace dat viz graf 4.10. a záznam dat viz tabulka 4.13.



Graf 4.10. Vliv různých sacharidů na relativní obsah vody (RWC) protokormů druhu *T. nuda* kultivovaných po dobu přibližně 4 měsíců na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaného sacharidu. Písmena nad boxploty značí výsledek testu mnohonásobného porovnání (MC test). Data a statistika viz tabulka 4.13.

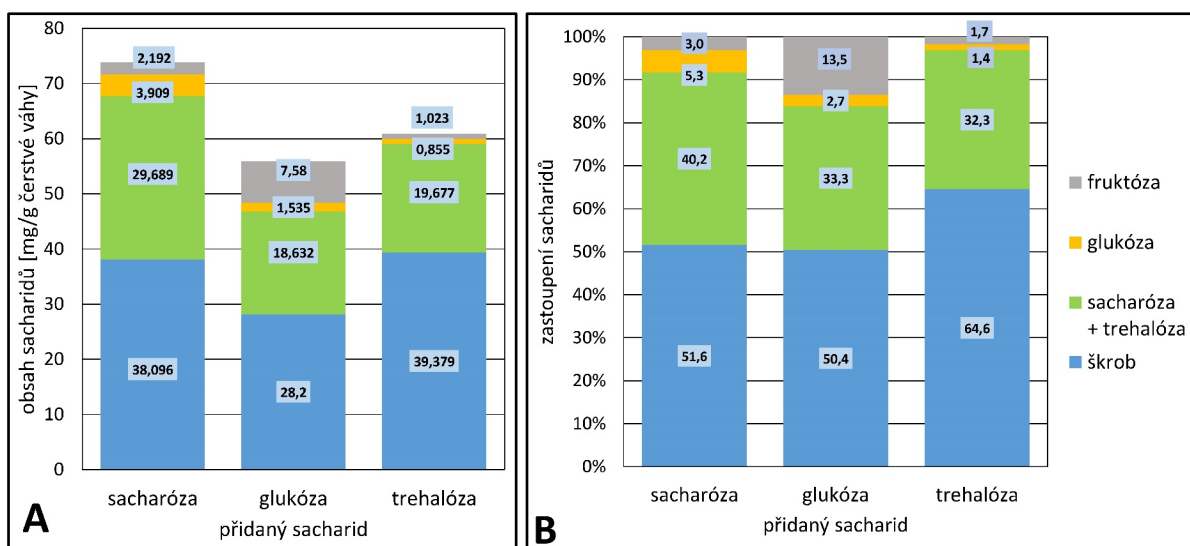
varianta	průměr	SD	n	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	90,5	0,4	3	KW	0,083	a
glukóza	87,1	2,3	3			a
trehalóza	90	0,6	4			a
žádný	81	16	3			a

Tabulka 4.13. Relativní obsah vody protokormů druhu *T. nuda* v procentech na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, KW – Kruskalův-Wallisův test následovaný KW-testem mnohonásobného porovnání (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

4.1.4.4. Obsah rozpustných sacharidů a škrobu *T. nuda*

Obsah sacharidů v protokormech druhu *T. nuda* byl na všech variantách média vyšší než u kontrolního média, kde byl obsah sacharidů pod detekčním limitem použité techniky měření. Z tohoto důvodu byla u *T. nuda* kontrolní varianta vyloučena ze všech statistických analýz obsahu sacharidů, nicméně je zřejmé, že se od ostatních vriant výrazně odlišuje. Protokormy se mezi zbylými variantami média statisticky průkazně neliší co do obsahu rozpustných sacharidů, celkového obsahu sacharidů, ani poměru cukry : škrob. V rámci všech těchto parametrů můžeme ovšem sledovat nejvyšší hodnotu na médiu SMS oproti variantám SMG a SMT, ačkoliv rozdíl je neprůkazný. Pouze na médiu SMS je obsah škrobu vyšší než obsah rozpustných sacharidů. Obsah škrobu se zdá být podobnější mezi variantami SMS a SMT, na SMG se zdá být škrobu méně, tyto rozdíly ovšem nejsou statisticky prokazatelné.

Statisticky významný je zde rozdíl v obsahu sacharózy a trehalózy (dohromady) mezi variantami média, kdy nejvyšší je na médiu SMS. Srovnatelný je obsah těchto sacharidů u médií SMS a SMT. Výsledky jsou vizualizovány v grafu 4.11. a zaznamenány v tabulce 4.14.



Graf 4.11. Vliv různých sacharidů na obsah (A) a zastoupení (B) endogenních sacharidů v protokormech druhu *T. nuda* kultivovaných po dobu přibližně 4 měsíců na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaného sacharidu. Čísla v boxech představují průměr obsahu daného sacharidu v protokormech na dané variantě média (A), a procento, které daný sacharid představuje z celkového obsahu sacharidů v protokormech na dané variantě média (B). Data a statistika viz tabulka 4.14.

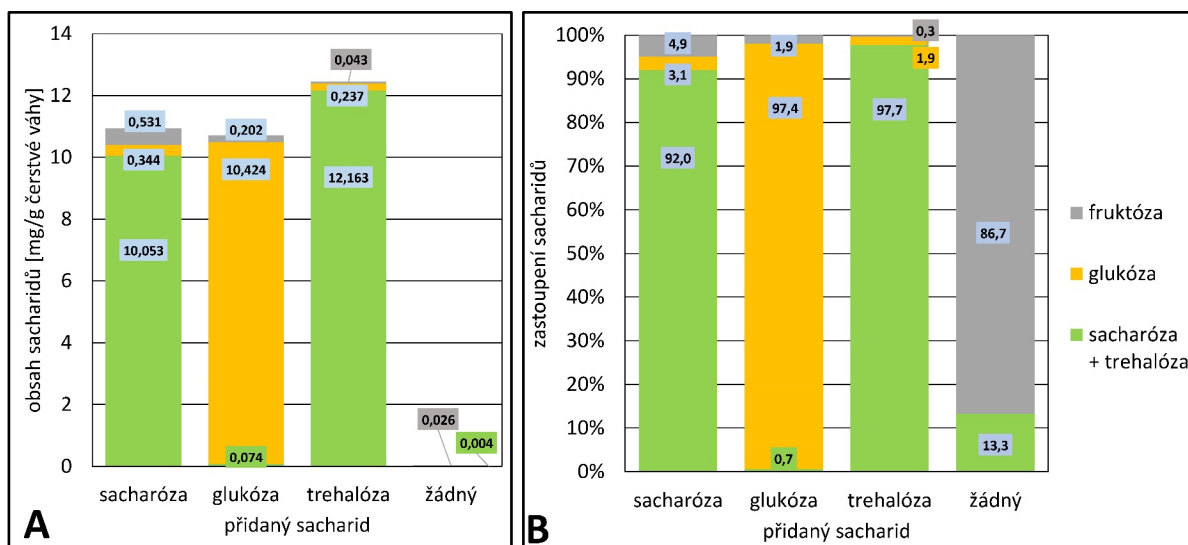
sacharid	varianta	průměr	SD	n	test	p-hodnota	MC test
sacharóza + trehalóza	sacharóza	29,689	2,507	3	OWA	0,00027	a
	glukóza	18,632	1,363	3			b
	trehalóza	19,677	1,649	4			b
glukóza	sacharóza	3,909	0,993	3	OWA	0,00056	a
	glukóza	1,535	0,252	3			b
	trehalóza	0,855	0,219	4			b
fruktóza	sacharóza	2,192	1,231	3	KW	0,23	a
	glukóza	7,58	10,84	3			a
	trehalóza	1,023	0,929	4			a
škrob	sacharóza	38,096	17,847	3	OWA	0,19	a
	glukóza	28,2	5,754	3			a
	trehalóza	39,379	30,244	3			a
rozpuštěné	sacharóza	35,79	0,699	3	KW	0,082	a
	glukóza	27,747	10,62	3			a
	trehalóza	21,555	2,308	3			a

rozpuštěné + škrob	sacharóza	73,886	17,781	3	OWA	0,52	a
	glukóza	55,947	15,537	3			a
	trehalóza	51,089	33,859	3			a
rozpuštěné : škrob (%)	sacharóza	106,872	42,359	3	OWA	0,54	a
	glukóza	97,402	23,157	3			a
	trehalóza	74,59	36,339	3			a

Tabulka 4.14. Obsah sacharidů (sacharid) v protokormech druhu *T. nuda* v mg/g čerstvé váhy a poměr rozpustných sacharidů a škrobu v procentech na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, OWA – jednocestná ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem (MC test), KW – Kruskalův-Wallisův test následovaný KW-testem mnohonásobného porovnání (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

4.1.4.5. Obsah sacharidů v médiu *T. nuda*

Obsah všech sacharidů v kontrolním médiu zde byl výrazně menší než v médiích s přidanými sacharidy. Glukóza v kontrolním médiu nebyla vůbec naměřena. Naopak na sacharózovém a trehalózovém médiu bylo naměřeno poměrně velké množství glukózy a u sacharózového média i fruktózy. Data jsou vizualizována v grafu 4.12. a zaznamenána v tabulce 4.15.



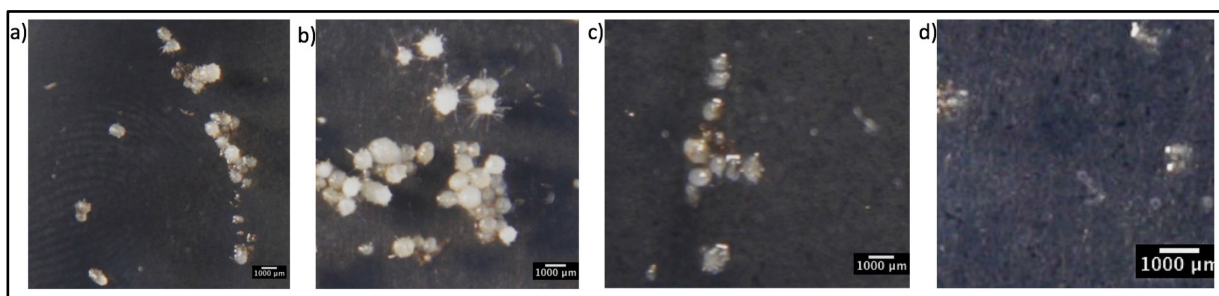
Graf 4.12. Obsah (A) a zastoupení (B) sacharidů v médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaných sacharidů po přibližně 4 měsících kultivace protokormů druhu *T. nuda*. Čísla v boxech představují průměr obsahu daného sacharidu v daném médiu (A), a procento, které daný sacharid představuje z celkového obsahu sacharidů v daném médiu (B). Data a statistika viz tabulka 4.15.

sacharid	varianta	průměr	SD	n
sacharóza + trehalóza	sacharóza	10,053	1,13	3
	glukóza	0,074	0,034	3
	trehalóza	12,163	0,846	3
	žádný	0,004	0,001	3
glukóza	sacharóza	0,344	0,152	3
	glukóza	10,424	0,842	3
	trehalóza	0,237	0,046	3
	žádný	0	0	3
fruktóza	sacharóza	0,531	0,186	3
	glukóza	0,202	0,05	3
	trehalóza	0,043	0,014	3
	žádný	0,026	0,002	3

Tabulka 4.15. Obsah sacharidů (sacharid) v médiu SMS s různými přidanými sacharidy (varianta) po kultivaci protokormů druhu *T. nuda* v mg/g čerstvé váhy. SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů.

4.1.5. *Diuris magnifica*

Výsev tohoto druhu se zdařil a byly získány vzorky pro všechny plánované analýzy. Fotografie protokormů viz obrázek 4.4.

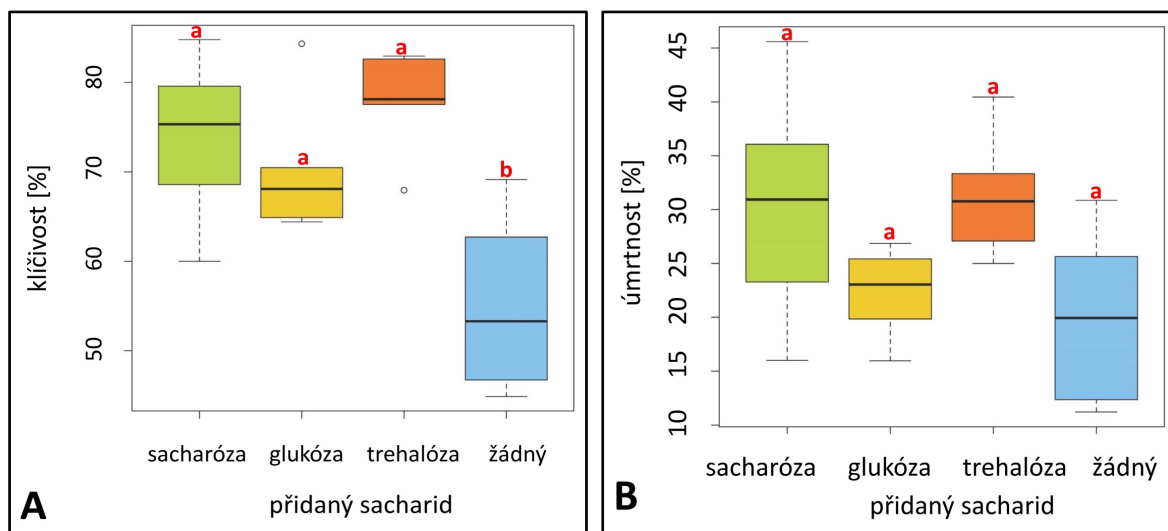


Obrázek 4.4. Protokormy *D. magnifica* po přibližně 4 měsících kultivace na médiu SMS se sacharózou (a), glukózou (b), trehalózou (c), a bez přidaných sacharidů (d).

4.1.5.1. Klíčivost a úmrtnost *D. magnifica*

Klíčivost se u tohoto druhu statisticky významně lišila mezi variantami. Průkazně menší byla klíčivost na médiu kontrolním (SMK). Statisticky významný rozdíl byl i mezi variantami v úmrtnosti. Malý počet opakování ale patrně vedl k tomu, že síla MC testu byla příliš nízká na prokázání rozdílu mezi variantami.

Z výsledků se ovšem zdá, že úmrtnost byla o něco vyšší na médiích SMS a SMT a nižší na médiích SMG a SMK. Vizualizace a výsledky viz graf 4.13. tabulka 4.16 a 4.17.



Graf 4.13. Vliv různých sacharidů na klíčivost (A) a úmrtnost (B) druhu *D. magnifica* kultivovaných po dobu přibližně 4 měsíců na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaného sacharidu. Písmena nad boxploty značí výsledek testu mnohonásobného porovnání (MC test). Data a statistika viz tabulka 4.16. a 4.17.

varianta	průměr	SD	n	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	74	8,1	8	OWA	0,00044	a
glukóza	70	7,5	6			a
trehalóza	77,8	6,1	5			a
žádný	55	9,7	6			b

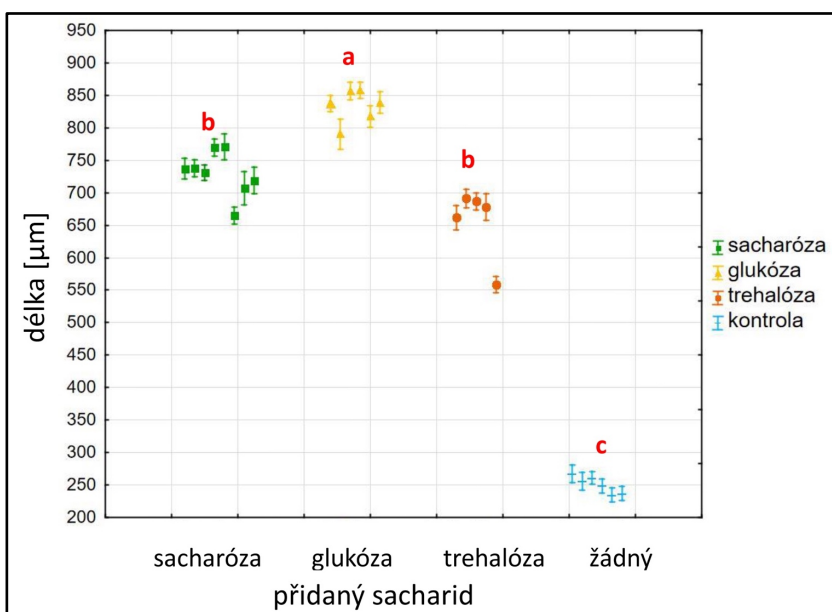
Tabulka 4.16. Klíčivost druhu *D. magnifica* v procentech na médiu SMS s různými sacharidy (varianta) v procentech. SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, OWA – jednocestná ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

varianta	průměr	SD	n	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	30,3	9,9	8	OWA	0,038	a
glukóza	22,4	4	6			a
trehalóza	31,3	6	5			a
žádný	20	7,8	6			a

Tabulka 4.17. Úmrtnost druhu *D. magnifica* v procentech na médiu SMS s různými sacharidy (varianta) v procentech. SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, OWA – jednocestná ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

4.1.5.2. Velikost protokormů *D. magnifica*

Velikost protokormů se u druhu *D. magnifica* mezi variantami média statisticky významně lišila. MC test ukázal, že průkazně největší byly protokormy na médiu s glukózou, průkazně menší na médiu SMS, průkazně ještě menší na médiu SMT a průkazně nejmenší na médiu SMK. Největší část meziskupinové variability je opět dána rozdílem mezi médii se sacharidy a médiem bez sacharidů. Výsledky viz graf 4.14. a tabulka 4.18. U tohoto druhu byla z variability velikosti protokormů vysvětlena převážná část variantou média (přes 80 %), několik procent vysvětlila proměnná Petriho miska a část variability zůstala nevysvětlena.



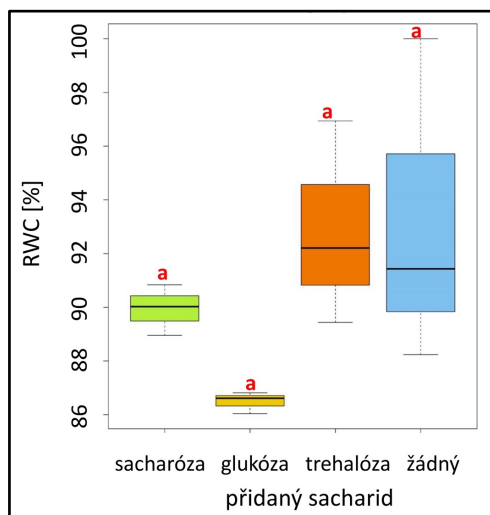
Graf 4.14. Vliv různých sacharidů na maximální průměr protokormů *D. magnifica* kultivovaných po dobu přibližně 4 měsíců na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaného sacharidu. Chybové úsečky představují střední chybu průměru, symboly uprostřed úseček znázorňují průměr, jednotlivé úsečky pak představují jednotlivé Petriho misky a varianty média jsou odlišeny barvou úseček a typem symbolu. Písmena nad úsečkami značí výsledek testu mnohonásobného porovnání (MC test). Data a statistika viz tabulka 4.18.

varianta	průměr	SD	n	nd	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	729,3	163,5	610	8	NDA	$<1 \times 10^{-6}$	b
glukóza	840,5	178	465	6			a
trehalóza	646,7	143,3	384	5			c
žádný	249,3	54,5	818	6			d

Tabulka 4.18. Maximální průměr protokormů druhu *D. magnifica* v μm na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, nd – počet Petriho misek, NDA – hierarchická ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

4.1.5.3. Relativní obsah vody *D. magnifica*

U tohoto druhu se relativní obsah vody mezi variantami statisticky významně nelišil. Můžeme zde ale sledovat nízkou hodnotu RWC u varianty SMG a vysokou hodnotu RWC u variant SMT a SMK, rozdíl mezi variantami je ale neprůkazný (graf 4.15., tabulka 4.19.).



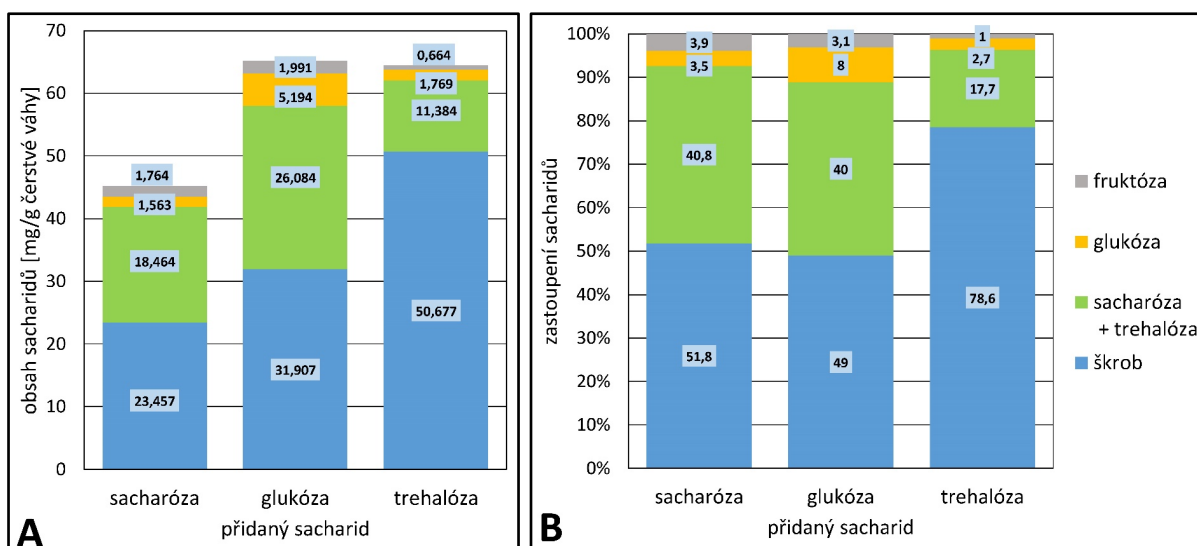
Graf 4.15. Vliv různých sacharidů na relativní obsah vody (RWC) protokormů *D. magnifica* kultivovaných po dobu přibližně 4 měsíců na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaného sacharidu. Písmena nad boxploty značí výsledek testu mnohonásobného porovnání (MC test). Data a statistika viz tabulka 4.19.

varianta	průměr	SD	n	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	89,9	0,9	3	WFT	0,16	a
glukóza	86,5	0,4	3			a
trehalóza	92,9	3,8	3			a
žádný	93,2	6,1	3			a

Tabulka 4.19. RWC protokormů druhu *D. magnifica* v procentech na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, WFT – Welchův F-test následovaný Tukeyho HSD testem (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

4.1.5.4. Obsah rozpustných sacharidů a škrobu *D. magnifica*

Mezi variantami se statisticky významně lišil celkový obsah sacharidů, kdy ovšem nebyl prokázán rozdíl v MC testu mezi variantami, pravděpodobně v důsledku nízké síly testu. Nejméně však obsahovaly sacharidů protokormy varianty SMS. Nejzastoupenějším sacharidem přitom u všech variant byl škrob a z rozpustných poté sacharóza dohromady s trehalózou. Obsah rozpustných sacharidů se mezi variantami statisticky významně lišil, kdy nejvíce bylo cukrů v protokormech pěstovaných na médiu SMG, poté na SMT a nejméně na SMS. U druhu *D. magnifica* se průkazně lišil obsah některých dílčích sacharidů v protokormech mezi variantami média. Statisticky významný rozdíl byl pozorován v obsahu glukózy, kdy této bylo nejvíce na médiu SMG. Průkazně se lišil i obsah fruktózy mezi variantami, kdy její nejnižší obsah byl naměřen na protokormech na médiu SMT. Odlišný byl i obsah škrobu mezi variantami. Pozorovatelně, i když neprůkazně, je oproti médiím SMG a SMS více škrobu na médiu SMT. Výsledky viz graf 4.16. a tabulka 4.20.



Graf 4.16. Vliv různých sacharidů na obsah (A) a zastoupení (B) endogenních sacharidů v protokormech druhu *D. magnifica* kultivovaných po dobu přibližně 4 měsíců na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaného sacharidu. Čísla v boxech představují průměr obsahu daného sacharidu v protokormech na dané variantě média (A), a procento, které daný sacharid představuje z celkového obsahu sacharidů v protokormech na dané variantě média (B). Data a statistika viz tabulka 4.20.

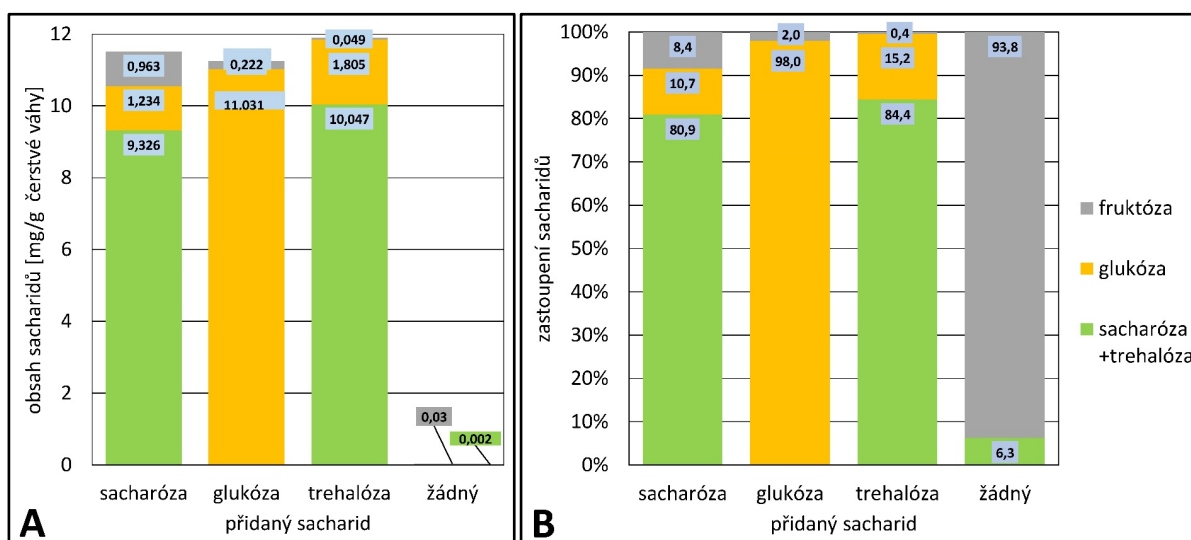
sacharid	varianta	průměr	SD	n	test	p-hodnota	MC test
sacharóza + trehalóza	sacharóza	18,464	1,017	3	OWA	0,078	a
	glukóza	26,084	4,534	3			a
	trehalóza	11,384	9,96	3			a
glukóza	sacharóza	1,563	0,5	3	OWA	0,012	b
	glukóza	5,194	0,563	3			a
	trehalóza	1,769	1,72	3			b
fruktóza	sacharóza	1,764	0,469	3	OWA	0,01	a
	glukóza	1,991	0,365	3			a
	trehalóza	0,664	0,26	3			b
škrob	sacharóza	23,457	0,741	3	KW	0,022	b
	glukóza	31,907	3,581	3			ab
	trehalóza	50,677	21,61	3			ab
	kontrola	313,461	112,108	3			a

rozpuštěné	sacharóza	21,791	1,37	3	OWA	0,049	ab
	glukóza	33,269	4,907	3			a
	trehalóza	13,817	11,82	3			b
rozpuštěné + škrob	sacharóza	45,248	0,63	3	WFT	0,038	a
	glukóza	65,176	6,051	3			a
	trehalóza	64,494	22,287	3			a
rozpuštěné : škrob (%)	sacharóza	48,137	2,346	3	WFT	0,234	a
	glukóza	50,967	4,416	3			a
	trehalóza	21,67	21,672	3			a

Tabulka 4.20. Obsah sacharidů (sacharid) u druhu *D. magnifica* v mg/g čerstvé váhy a poměr rozpustných sacharidů a škrobu v procentech na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, OWA – jednocestná ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem (MC test), KW – Kruskalův-Wallisův test následovaný KW-testem mnohonásobného porovnání (MC test), WFT – Welchův F-test následovaný Tukeyho HSD testem (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

4.1.5.5. Obsah sacharidů v médiu *D. magnifica*

Obsah sacharidů v kontrolním médiu byl velice nízký, glukóza zde nebyla naměřena žádná a množství fruktózy a glukózy bylo minimální. Sdružený obsah sacharózy a trehalózy byl podobný. V médiu SMS bylo naměřeno nejvíce sacharózy a menší množství glukózy a fruktózy. V médiu SMG nebyl obsah sacharózy a trehalózy detekován. Naopak v tomto médiu bylo naměřeno nejvyšší množství glukózy. Výsledky viz graf 4.17. a tabulka 4.21.



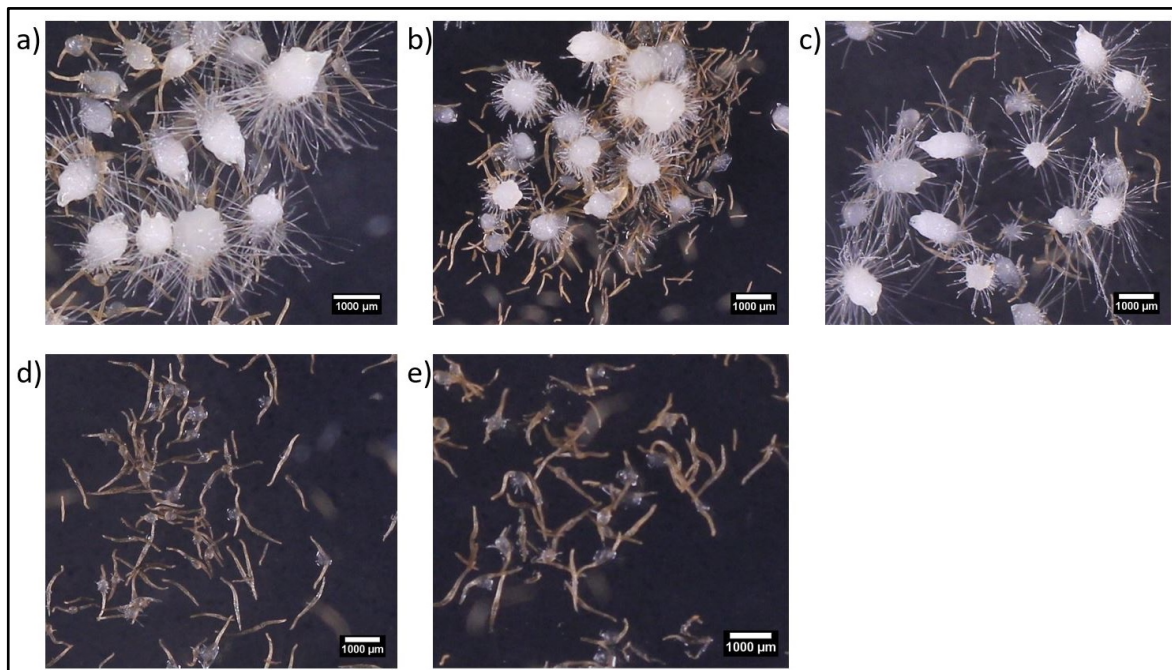
Graf 4.17. Obsah (A) a zastoupení (B) sacharidů v médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaných sacharidů po přibližně 4 měsících kultivace protokormů druhu *D. magnifica*. Čísla v boxech představují průměr obsahu daného sacharidu v daném médiu (A), a procento, které daný sacharid představuje z celkového obsahu sacharidů v daném médiu (B). Data a statistika viz tabulka 4.21.

sacharid	varianta	průměr	SD	n
sacharóza + trehalóza	sacharóza	9,326	0,395	3
	glukóza	0	0	3
	trehalóza	10,047	0,235	3
	žádný	0,002	0,001	3
glukóza	sacharóza	1,234	0,171	3
	glukóza	11,031	0,249	3
	trehalóza	1,805	0,944	3
	žádný	0	0	3
fruktóza	sacharóza	0,963	0,157	3
	glukóza	0,222	0,003	3
	trehalóza	0,049	0,031	3
	žádný	0,03	0,004	3

Tabulka 4.21. Obsah sacharidů (sacharid) v médiu SMS s různými přidanými sacharidy (varianta) po kultivaci protokormů druhu *D. magnifica* v mg/g čerstvé váhy. SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů.

4.1.6. *Ludisia discolor*

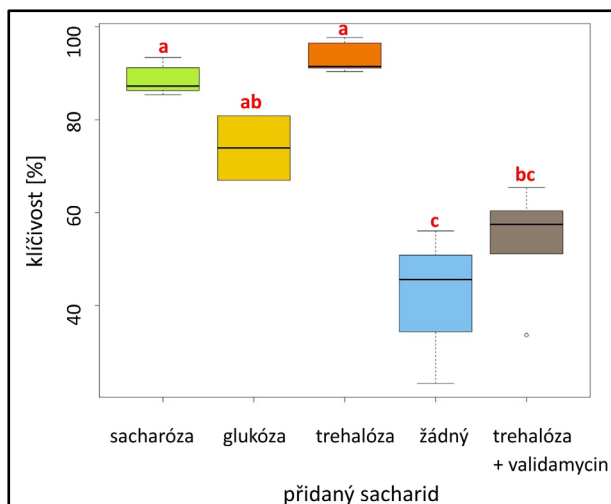
Výsev tohoto druhu se zdařil. Na rozdíl od ostatních druhů zde byla navíc testována varianta média SMTV s přidaným validamycinem A – označená SMTV. Fotografie protokormů na různých variantách média viz obrázek 4.5.



Obrázek 4.5. Protokormy *L. discolor* po přibližně dvou měsících kultivace na médiu SMS se sacharózou (a), glukózou (b), trehalózou (c), bez přidaných sacharidů (d) a s trehalózou a validamycinem A (e).

4.1.6.1. Klíčivost a úmrtnost druhu *L. discolor*

Klíčivost semen na různých variantách se u tohoto druhu statisticky velice významně lišila. Nejvyšší klíčivost byla na médiích SMT a SMS, nižší na médiích SMG a SMK a nejnižší na médiu SMTV. Média SMT a SMTV jsou zcela nesrovnatelné v ohledu klíčivosti. Výsledky viz graf 4.18. a tabulka 4.22. Úmrtnost druhu *L. discolor* byla na všech médiích nulová, a proto zde není uvedena tabulka, ani graf.



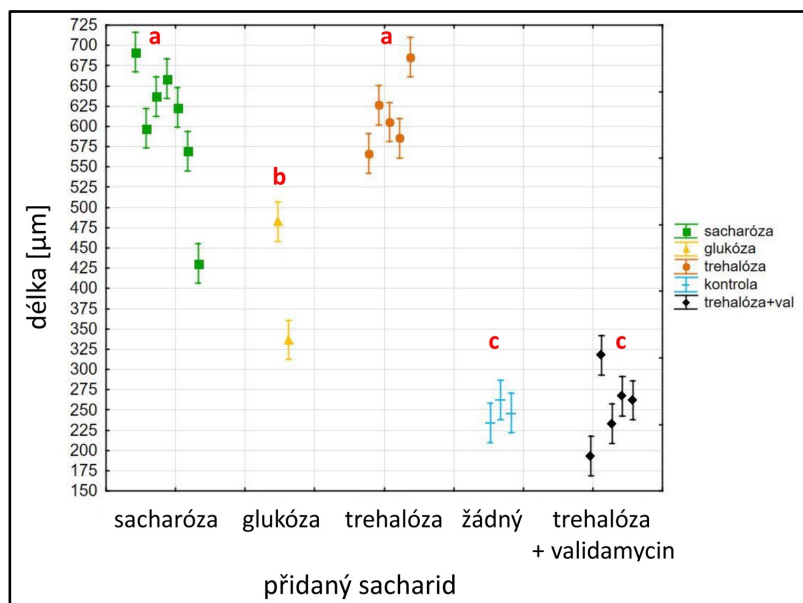
Graf 4.18. Vliv různých sacharidů na klíčivost druhu *L. discolor* kultivovaných po dobu přibližně 2 měsíců na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou, bez přidaného sacharidu a s trehalózou společně s validamycinem A. Písmena nad boxploty značí výsledek testu mnohonásobného porovnání (MC test). Data a statistika viz tabulka 4.22.

varianta	průměr	SD	n	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	88,7	3,3	7	WFT	$<1 \times 10^{-6}$	a
glukóza	73,9	-	2			ab
trehalóza	93,4	3,4	5			a
žádný	41,6	16,8	3			bc
trehalóza + validamycin	53,6	12,3	5			c

Tabulka 4.22. Klíčivost druhu *L. discolor* v procentech na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, WFT – Welchův F-test následovaný Tukeyho HSD testem (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

4.1.6.2. Velikost protokormů *L. discolor*

Velikost protokormů byla u druhu *L. discolor* statisticky velmi významně rozdílná. Největší byly protokormy na médiích SMT a SMS, průkazně menší na médiu SMG a nejmenší na médiích SMK a SMTV. Počet misek s médiem SMG byl nízký v důsledku kontaminace. Počet protokormů byl ale pro statistickou analýzu dostatečný (200), pouze odhad efektu misek může být touto skutečností ovlivněn. Z celkové variability bylo vysvětleno variantou média necelých 40 %, miskou přibližně 4 % a zbytek variability zůstal nevysvětlen. Výsledky jsou vizualizovány a zaznamenány v grafu 4.19 a v tabulce 4.23.



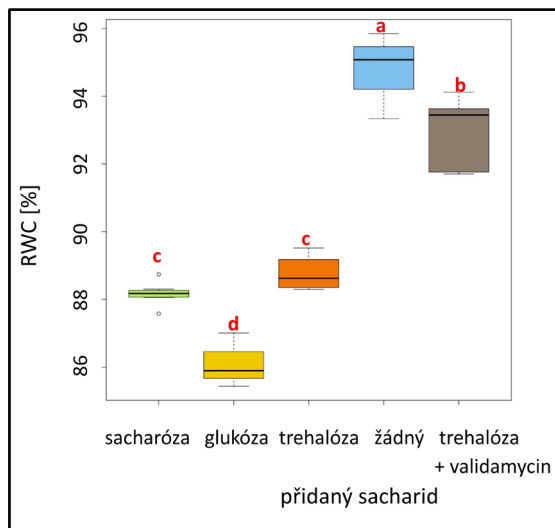
Graf 4.19. Vliv různých sacharidů na maximální průměr protokormů *L. discolor* kultivovaných po dobu přibližně 2 měsíců na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou, bez přidaného sacharidu a s trehalózou společně s validamycinem A. Chybové úsečky představují střední chybu průměru, symboly uprostřed úseček znázorňují průměr, jednotlivé úsečky pak představují jednotlivé Petriho misky a varianty média jsou odlišeny barvou úseček a symbolů a typem symbolu. Písmena nad úsečkami značí výsledek testu mnohonásobného porovnání (MC test). Data a statistika viz tabulka 4.23.

varianta	průměr	SD	n	nd	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	601,2	270,4	700	7	NDA	$<1 \times 10^{-6}$	a
glukóza	409,6	262,6	200	2			b
trehalóza	613,9	257,00	500	5			a
žádný	247,5	80,4	300	3			c
trehalóza + validamycin	254,5	270,1	500	5			c

Tabulka 4.23. Maximální průměr protokormů druhu *Ludisia discolor* v μm na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, nd – počet Petriho misek, NDA – hierarchická ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

4.1.6.3 Relativní obsah vody *L. discolor*

Rozdíl mezi variantami média byl co do RWC protokormů statisticky velice významný. Průkazně nejvyšší RWC byl u média SMK a dále u média SMTV. V porovnání s ostatními médii byl RWC těchto dvou variant výrazně vyšší. Srovnatelný RWC byl u médií SMT a SMS. Nejnížší RWC byl naměřen na médiu SMG. Výsledky jsou zaznamenány v grafu 4.20. a v tabulce 4.24. Od média SMG byly dostupné jen 2 misky, z toho důvodu byly z jedné misky odebrány dva vzorky, což mohlo do určité míry ovlivnit výsledek u této varianty.



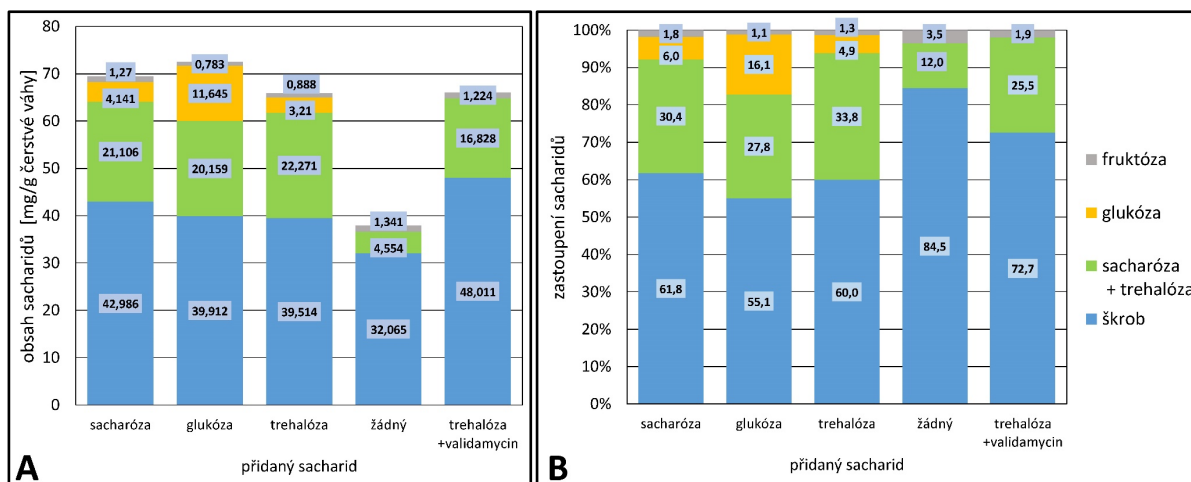
Graf 4.20. Vliv různých sacharidů na relativní obsah vody (RWC) protokormů druhu *L. discolor* kultivovaných po dobu přibližně 2 měsíců na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou, bez přidaného sacharidu a s trehalózou společně s validamycinem A. Písmena nad boxploty značí výsledek testu mnohonásobného porovnání (MC test). Data a statistika viz tabulka 4.24.

varianta	průměr	SD	n	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	88,2	0,3	7	KW	$<1 \times 10^{-6}$	c
glukóza	86,1	0,8	3			d
trehalóza	88,8	0,6	4			c
žádný	94,8	1,3	3			a
trehalóza + validamycin	92,9	1,1	5			b

Tabulka 4.24. RWC protokormů druhu *L. discolor* v procentech na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, KW – Kruskalův-Wallisův test následovaný KW-testem mnohonásobného porovnání (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

4.1.6.4. Obsah rozpustných sacharidů a škrobu *L. discolor*

Mezi variantami se statisticky významně lišil celkový obsah sacharidů, což bylo patrně způsobeno statisticky významným rozdílem v obsahu cukrů, obsah škrobu se totiž mezi variantami nelišil. Mezi variantami se statisticky významně lišil poměr obsahu cukrů a škrobu, což v tomto případě je pravděpodobně opět dáno zejména rozdílem v obsahu cukrů. Nejvíce sacharidů bylo průkazně ve variantách SMS a SMG, o něco méně a srovnatelně na médiích SMT a SMTV a průkazně nejméně ve variantě SMK. Ze sacharidů byl u všech variant celkově nejzastoupenější škrob a po něm sacharóza sloučená s trehalózou. Obsah sacharózy s trehalózou se u protokormů průkazně lišil – nejnížší obsah byl na médiu SMK. Obsah těchto sacharidů byl srovnatelný na médiích SMS, SMG, SMT a SMTV a rozdíl mezi SMTV a SMK. Obsah glukózy byl totiž na médiu SMTV nulový, srovnatelný s médiem SMK. Média SMK a SMTV byla z tohoto důvodu vyřazena ze statistické analýzy obsahu glukózy. Obsah glukózy byl jinak průkazně nejvyšší na médiu SMG, nižší a srovnatelný potom na médiích SMS a SMT. Co se týče fruktózy, bylo KW testem prokázáno, že se protokormy v obsahu tohoto sacharidu liší, ovšem MC test neprokázal, patrně kvůli nízkému počtu pozorování, rozdíl mezi jednotlivými variantami. Meziskupinová variabilita vedoucí k zamítnutí nulové hypotézy KW testu ovšem patrně byla způsobená nižším obsahem fruktózy u variant SMT a SMG. Výsledky jsou zaznamenány v grafu 4.21. a v tabulce 4.25.



Graf 4.21. Vliv různých sacharidů na obsah (A) a zastoupení (B) endogenních sacharidů v protokormech druhu *L. discolor* kultivovaných po dobu přibližně 2 měsíců na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou, bez přidaného sacharidu a s trehalózou společně s validamycinem A. Čísla v boxech představují průměr obsahu daného sacharidu v protokormech na dané variantě média (A), a procento, které daný sacharid představuje z celkového obsahu sacharidů v protokormech na dané variantě média (B). Statistická analýza a data ke grafu viz tabulka 4.25.

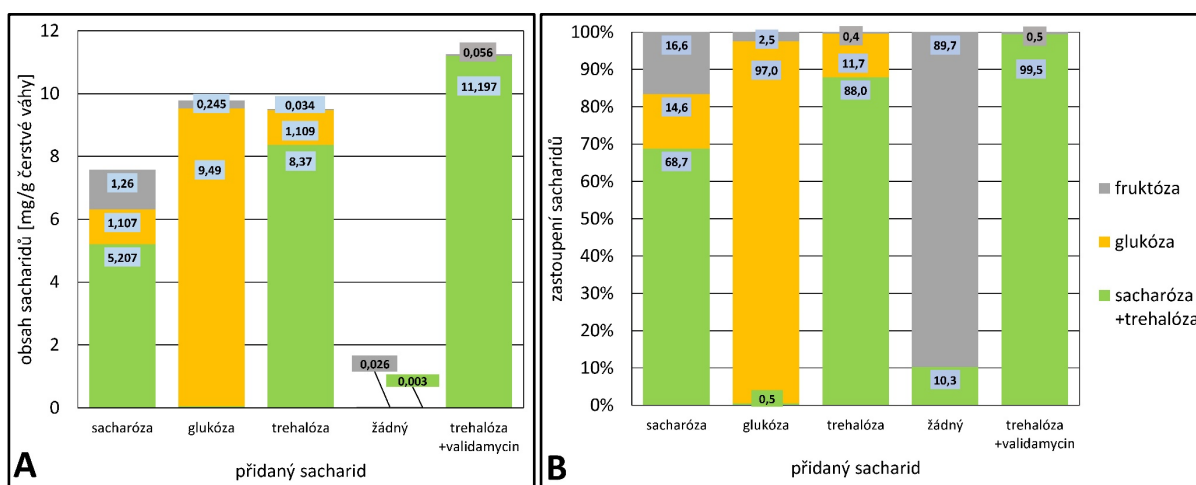
sacharid	varianta	průměr	SD	n	test	p-hodnota	MC test
sacharóza + trehalóza	sacharóza	21,106	4,538	7	KW	0,0026	a
	glukóza	20,159	1,446	3			a
	trehalóza	22,271	2,442	4			a
	žádný	4,554	1,511	3			b
	trehalóza + validamycin	16,828	0,414	5			a
glukóza	sacharóza	4,141	1,481	7	OWA	2,6×10 ⁻⁶	b
	glukóza	11,645	0,819	3			a
	trehalóza	3,21	0,632	4			b
	žádný	0	0	3	-	-	-
	trehalóza + validamycin	0	0	5			-

fruktóza	sacharóza	1,27	0,363	7	KW	0,037	a
	glukóza	0,783	0,45	3			a
	trehalóza	0,888	0,051	4			a
	žádný	1,341	0,237	3			a
	trehalóza +validamycin	1,224	0,858	5			a
škrob	sacharóza	42,986	3,856	7	WFT	0,51	a
	glukóza	39,912	24,713	3			a
	trehalóza	39,514	3,041	4			a
	žádný	32,065	12,048	3			a
	trehalóza +validamycin	48,011	15,521	5			a
rozpustné	sacharóza	26,518	6,221	7	KW	0,0018	a
	glukóza	32,588	0,974	3			a
	trehalóza	26,37	2,989	4			a
	žádný	5,895	1,625	3			c
	trehalóza +validamycin	18,052	0,661	5			b
rozpustné + škrob	sacharóza	69,504	8,988	7	OWA	0,033	a
	glukóza	72,5	25,246	3			a
	trehalóza	65,884	3,8	4			ab
	žádný	37,96	13,672	3			b
	trehalóza +validamycin	66,063	15,616	5			ab
rozpustné : škrob (%)	sacharóza	61,54	11,251	7	OWA	0,00025	ab
	glukóza	61,175	5,413	3			ab
	trehalóza	67,124	9,789	4			a
	žádný	18,833	1,799	3			c
	trehalóza +validamycin	41,774	16,35	5			bc

Předchozí strana: Tabulka 4.25. Obsah sacharidů (sacharid) v protokormech druhu *L. discolor* v mg/g čerstvé váhy a poměr rozpustných sacharidů a škrobu v procentech na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, OWA – jednocestná ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem (MC test), KW – Kruskalův-Wallisův test následovaný KW-testem mnohonásobného porovnání (MC test), WFT – Welchův F-test následovaný Tukeyho HSD testem (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

4.1.6.5. Obsah sacharidů v médiu *L. discolor*

Sdružený obsah sacharózy a trehalózy v médiu byl nejvyšší v médiu SMTV. Nejnížší pak byl obsah sacharózy a trehalózy v médiu SMG. Glukóza nebyla detekována v médiích SMK a SMTV. Nejvíce glukózy bylo naopak v médiu SMG. Fruktóza byla detekována ve všech variantách média, nejvyšší obsah fruktózy byl naměřen v médiu SMS. Zobrazení výsledků viz graf 4.22. a tabulka 4.26.



Graf 4.22. Obsah (A) a zastoupení (B) sacharidů v médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou, bez přidaných sacharidů a s trehalózou společně s validamycinem A po přibližně 2 měsících kultivace protokormů druhu *L. discolor*. Čísla v boxech představují průměr obsahu daného sacharidu v daném médiu (A), a procento, které daný sacharid představuje z celkového obsahu sacharidů v daném médiu (B). Data a statistika viz tabulka 4.26.

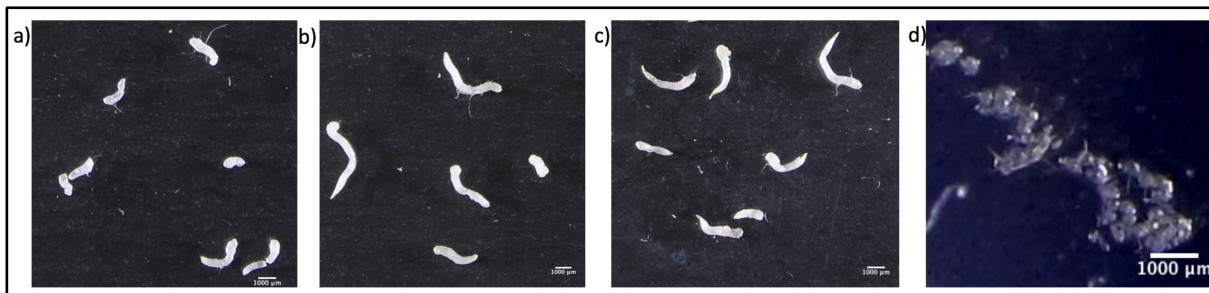
sacharid	varianta	průměr	SD	n
sacharóza + trehalóza	sacharóza	5,207	1,669	3
	glukóza	0,046	0,004	3
	trehalóza	8,37	0,255	3
	žádný	0,003	0,001	3
	trehalóza + validamycin	11,197	0,727	3

glukóza	sacharóza	1,107	0,296	3
	glukóza	9,49	0,179	3
	trehalóza	1,109	0,121	3
	žádný	0	0	3
	trehalóza +validamycin	0	0	3
fruktóza	sacharóza	1,26	0,453	3
	glukóza	0,245	0,019	3
	trehalóza	0,034	0,021	3
	žádný	0,026	0,006	3
	trehalóza +validamycin	0,056	0,014	3

Tabulka 4.26. Obsah sacharidů (sacharid) v médiu SMS s různými přidanými sacharidy (varianta) po kultivaci protokormů druhu *L. discolor* v mg/g čerstvé váhy. SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů.

4.1.7. *Pleione maculata*

Výsev tohoto druhu se zdařil a byly odebrány vzorky pro všechny plánované analýzy. Protokormy tohoto druhu jsou zdokumentovány na obrázku 4.6.



Obrázek 4.6. Protokormy *P. maculata* po necelých 5 měsících kultivace na médiu SMS se sacharózou (a), glukózou (b), trehalózou (c) a bez přidaných sacharidů (d)

4.1.7.1. Klíčivost a úmrtnost druhu *P. maculata*

Klíčivost semen tohoto druhu je velice vysoká u všech variant média. U všech variant byla přitom klíčivost srovnatelná. Úmrtnost byla u všech variant média téměř nulová, a proto nebyla provedena statistická analýza tohoto ukazatele. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.27., graf nebyl kvůli absenci rozdílů mezi variantami zahrnut.

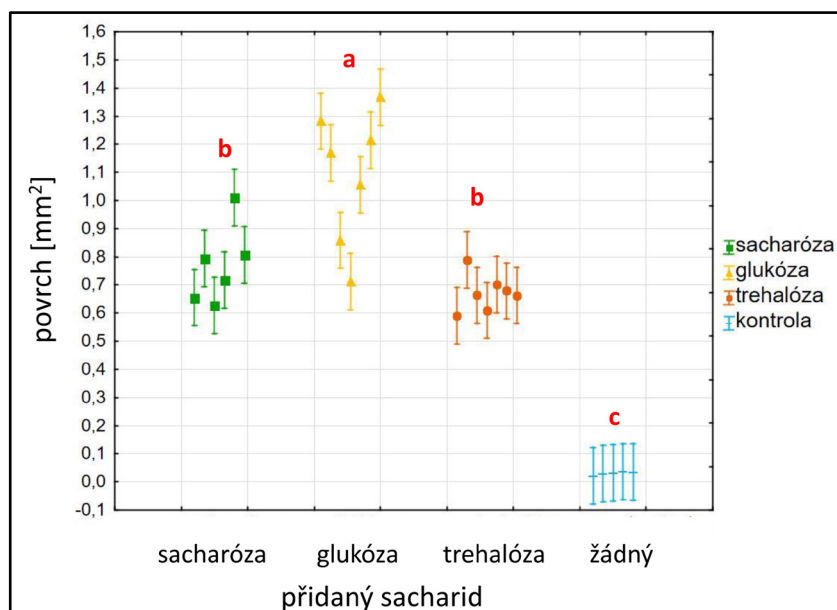
varianta	průměr	SD	n	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	95,9	2,2	6	KW	0,916	a
glukóza	90,7	18,3	7			a
trehalóza	91,5	14,8	7			a
žádný	95,0	4,4	5			a

Tabulka 4.27. Klíčivost druhu *P. maculata* v procentech na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, KW – Kruskalův-Wallisův test následovaný KW-MC testem mnohonásobného porovnání, hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

4.1.7.2. Velikost protokormů *P. maculata*

Protože protokormy tohoto druhu měly výrazně protáhlý tvar, nebyla velikost protokormů vyjádřena jako maximální průměr protokormů, ale jako plocha průmětu podélně položených protokormů. Velikost protokormů se u tohoto druhu statisticky významně lišila mezi variantami média. Největší protokormy byly na médiu SMG, menší a srovnatelné na médiu SMS a SMT, průkazně nejmenší na médiu SMK. Většina meziskupinové variability byla vytvořena rozdílem mezi variantami s přidaným sacharidem a mezi médiem SMK. Z celkové variability velikosti protokormů bylo vysvětleno necelých 40 % variantou média, přibližně 3 % Petriho miskou a zbytek variability nebyl modelem vysvětlen.

Výsledky viz graf 4.23. a tabulka 4.28.



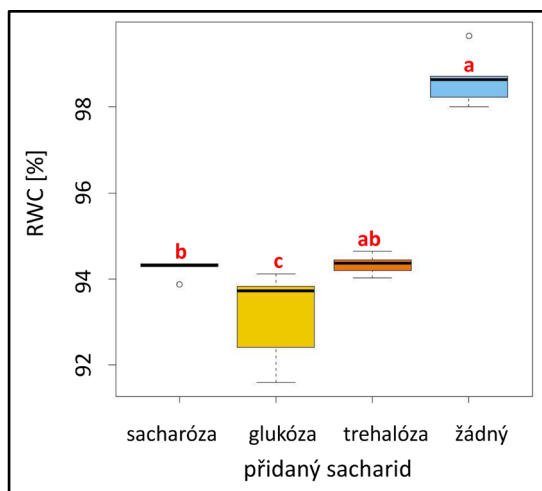
Graf 4.23. Vliv různých sacharidů na velikost protokormů *P. barbatum* kultivovaných po dobu necelých 5 měsíců na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaného sacharidu. Chybové úsečky představují střední chybu průměru, symboly uprostřed úseček znázorňují průměr, jednotlivé úsečky pak představují jednotlivé Petriho misky a varianty média jsou odlišeny barvou úseček a symbolů a typem symbolu. Písmena nad úsečkami značí výsledek testu mnohonásobného porovnání (MC test). Data a statistika viz tabulka 4.28.

varianta	průměr	SD	n	nd	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	768,3	501,2	180	6	NDA	0,002	b
glukóza	1089,5	774,5	210	7			a
trehalóza	667,8	543,0	210	7			b
žádný	30,7	12,9	150	5			c

Tabulka 4.28. Povrch protokormů druhu *P. maculata* v μm^2 na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, nd – počet Petriho misek, NDA – hierarchická ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

4.1.7.3. Relativní obsah vody *P. maculata*

Relativní obsah vody se mezi variantami statisticky velice průkazně lišil. Nejvyšší RWC byl naměřen na médiu SMK. Nižší RWC byl na médiu SMT a tento byl srovnatelný s o něco nižším RWC na médiu SMS. Nejnižší byl RWC průkazně na médiu SMG. Výsledky jsou zaznamenány a vizualizovány v grafu 4.24. a zaznamenány v tabulce 4.29.



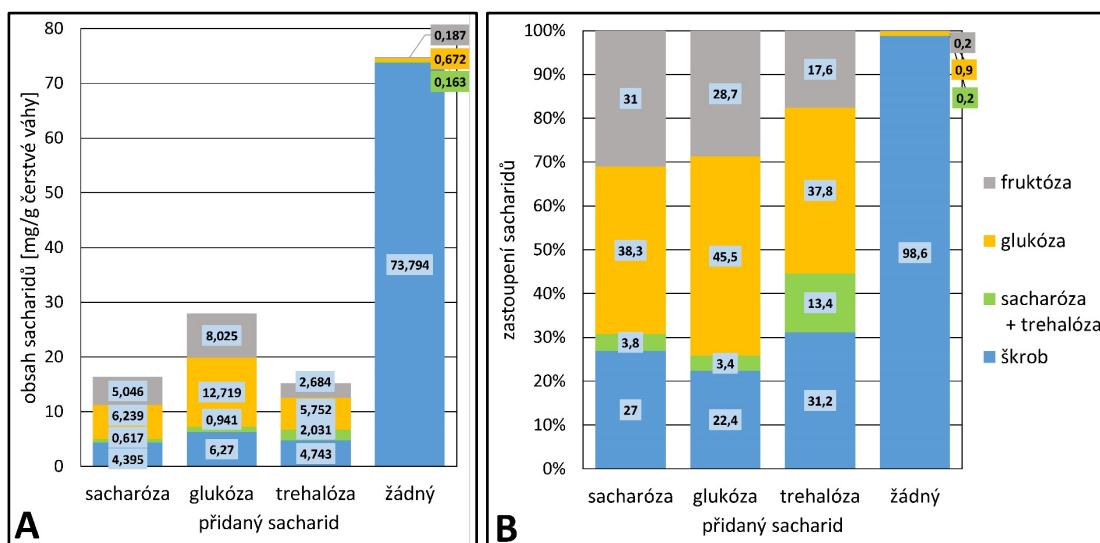
Graf 4.24. Vliv různých sacharidů na relativní obsah vody (RWC) protokormů druhu *P. maculata* kultivovaných po dobu necelých 5 měsíců na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaného sacharidu. Písmena nad boxploty značí výsledek testu mnohonásobného porovnání (MC test). Data a statistika viz tabulka 4.29.

varianta	průměr	SD	n	test	p-hodnota	MC test
sacharóza	94,2	0,2	5	WFT	0,00004	b
glukóza	93,1	1,1	5			c
trehalóza	94,3	0,2	5			ab
žádný	98,6	0,6	5			a

Tabulka 4.29. RWC protokormů druhu *P. maculata* v procentech na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, WFT – Welchův F-test následovaný Tukeyho HSD testem (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

4.1.7.4. Obsah rozpustných sacharidů a škrobu *P. maculata*

Celkový obsah sacharidů se mezi variantami statisticky významně lišil, ačkoliv následný MC test měl příliš nízkou sílu pro prokázání rozdílu mezi variantami. Přesto je zřejmé, že nejvíce sacharidů bylo na médiu SMK, kde bylo naměřeno statisticky významně nejvíce škrobu. Nejméně škrobu naopak bylo naměřeno u variant SMS a SMT. Mezi variantami se významně lišil i poměr obsahu cukrů a škrobu. Průkazně nejnižší byl tento poměr na variantě SMK, a naopak nejvyšší na variantě SMG, která byla na rozdíl od varianty SMK srovnatelná s variantami SMS a SMT. Co se týče obsahu cukrů, nejvyšší obsah byl průkazně na médiu SMG, naopak na médiu SMK byl obsah cukrů nejnižší. Obsah sacharózy a trehalózy dohromady se statisticky významně lišily mezi variantami. Nejvyšší obsah byl na médiu SMT, nižší a srovnatelný s SMT potom na médiu SMG, průkazně nejnižší byl obsah sacharózy a trehalózy na médiích SMS a SMK. Statisticky významný byl mezi variantami i rozdíl obsahu glukózy. Té bylo nejvíce na médiu SMG, kde protokormy exogenní glukózu patrně akumulují. Nižší a srovnatelný obsah glukózy byl na médiích SMS a SMT, průkazně nejmeně pak na médiu SMK. Statisticky průkazný byl i rozdíl v obsahu fruktózy. Obsah fruktózy přitom měl zcela stejný motiv, jako obsah glukózy. Statisticky významný byl i rozdíl v obsahu škrobu, kdy výrazně nejvíce škrobu obsahovaly protokormy na médiu SMK. Ostatní varianty byly co do obsahu škrobu srovnatelné, kdy nejvíce škrobu měla z těchto variant varianta SMG. Výsledky jsou zaznamenány v grafu 4.25. a v tabulce 4.30.



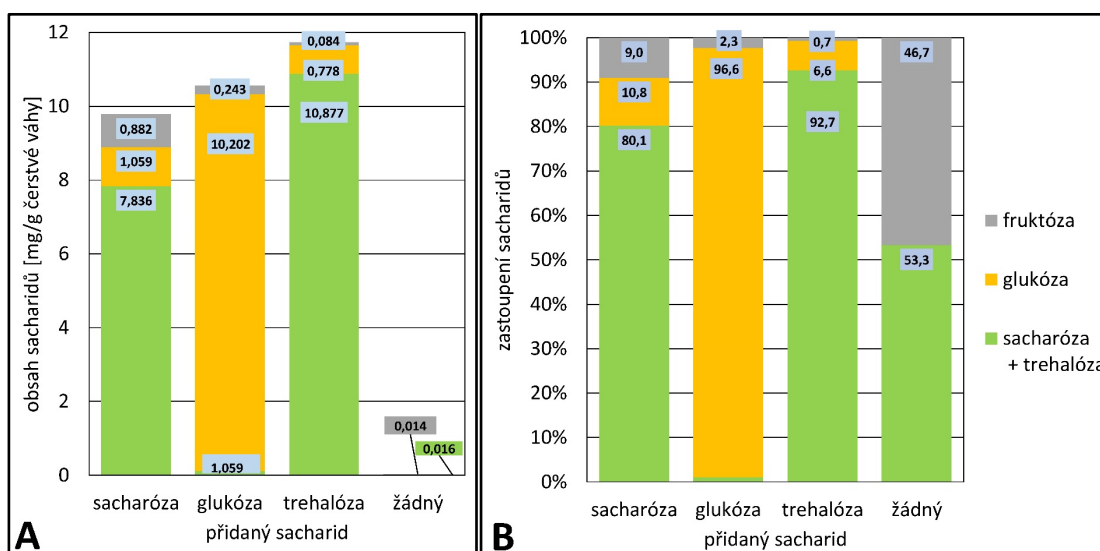
Graf 4.25. Vliv různých sacharidů na obsah (A) a zastoupení (B) endogenních sacharidů v protokormech druhu *P. maculata* kultivovaných po dobu necelých 5 měsíců na médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaného sacharidu. Čísla v boxech představují průměr obsahu daného sacharidu v protokormech na dané variantě média (A), a procento, které daný sacharid představuje z celkového obsahu sacharidů v protokormech na dané variantě média (B). Data a statistika viz tabulka 4.30.

sacharid	varianta	průměr	SD	n	test	p-hodnota	MC test
sacharóza + trehalóza	sacharóza	0,617	0,761	4	WFT	0,002	b
	glukóza	0,941	1,136	5			ab
	trehalóza	2,031	0,525	5			a
	žádný	0,163	0,153	4			b
glukóza	sacharóza	6,239	3,39	5	KW	0,0026	ab
	glukóza	12,719	1,82	5			a
	trehalóza	5,752	0,725	5			ab
	žádný	0,672	0,491	3			b
fruktóza	sacharóza	5,046	2,466	5	KW	0,0013	ab
	glukóza	8,025	1,257	5			a
	trehalóza	2,684	0,405	5			ab
	žádný	0,187	0,137	4			b
škrob	sacharóza	4,395	1,789	5	KW	0,017	b
	glukóza	6,27	2,858	5			ab
	trehalóza	4,743	2,33	5			b
	žádný	73,794	49,105	4			a
rozpustné	sacharóza	11,902	5,984	5	KW	0,0017	b
	glukóza	21,497	2,641	5			a
	trehalóza	10,468	1,273	5			b
	žádný	1,022	0,61	4			c
rozpustné + škrob	sacharóza	16,296	4,34	5	KW	0,038	a
	glukóza	27,767	3,294	5			a
	trehalóza	15,211	3,039	5			a
	žádný	40,427	36,063	4			a
rozpustné : škrob (%)	sacharóza	340,152	215,51	5	WFT	0,0014	ab
	glukóza	409,35	184,842	5			a
	trehalóza	257,482	108,978	5			ab
	žádný	2,144	1,79	3			b

Předchozí strana: Tabulka 4.30. Obsah sacharidů u druhu *P. maculata* v mg/g čerstvé váhy a poměr rozpustných sacharidů a škrobu v procentech na médiu SMS s různými sacharidy (varianta). SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů, KW – Kruskalův-Wallisův test následovaný KW-testem mnohonásobného porovnání (MC test), WFT – Welchův F-test následovaný Tukeyho HSD testem (MC test), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

4.1.7.5. Obsah sacharidů v médiu *P. maculata*

Obsah všech sacharidů v médiu SMK byl ze všech variant nejnižší, obsah glukózy byl v tomto médiu pod mezí detekce. Sdružený obsah sacharózy a trehalózy byl vysoký v médiích SMS a SMT, velice nízký byl na médiu SMG a SMK. Obsah glukózy byl vysoký v médiu SMG, malé množství glukózy bylo naměřeno i v médiu SMS a SMT. Obsah fruktózy byl ve všech variantách velice nízký, relativně vyšší v médiu SMS. Výsledky jsou vizualizovány v grafu 4.26. a zaznamenány v tabulce 4.31.



Graf 4.26. Obsah (A) a zastoupení (B) sacharidů v médiu SMS se sacharózou, s glukózou, s trehalózou a bez přidaných sacharidů po necelých 5 měsících kultivace protokormů druhu *P. maculata*. Čísla v boxech představují průměr obsahu daného sacharidu v daném médiu (A), a procento, které daný sacharid představuje z celkového obsahu sacharidů v daném médiu (B). Data viz tabulka 4.31.

sacharid	varianta	průměr	SD	n
sacharóza + trehalóza	sacharóza	7,836	1,138	3
	glukóza	0,118	0,025	3
	trehalóza	10,877	1,254	3
	žádný	0,016	-	2
glukóza	sacharóza	1,059	0,439	3
	glukóza	10,202	0,862	3
	trehalóza	0,778	0,397	3
	žádný	0	-	2

fruktóza	sacharóza	0,882	0,498	3
	glukóza	0,243	0,036	3
	trehalóza	0,084	0,004	3
	žádný	0,014	-	2

Tabulka 4.31. Obsah sacharidů (sacharid) v médiu SMS s různými přidanými sacharidy (varianta) po kultivaci protokormů druhu *P. maculata* v mg/g čerstvé váhy. SD – směrodatná odchylka, n – počet objektů.

4.1.8. Čeleď Hypoxidaceae

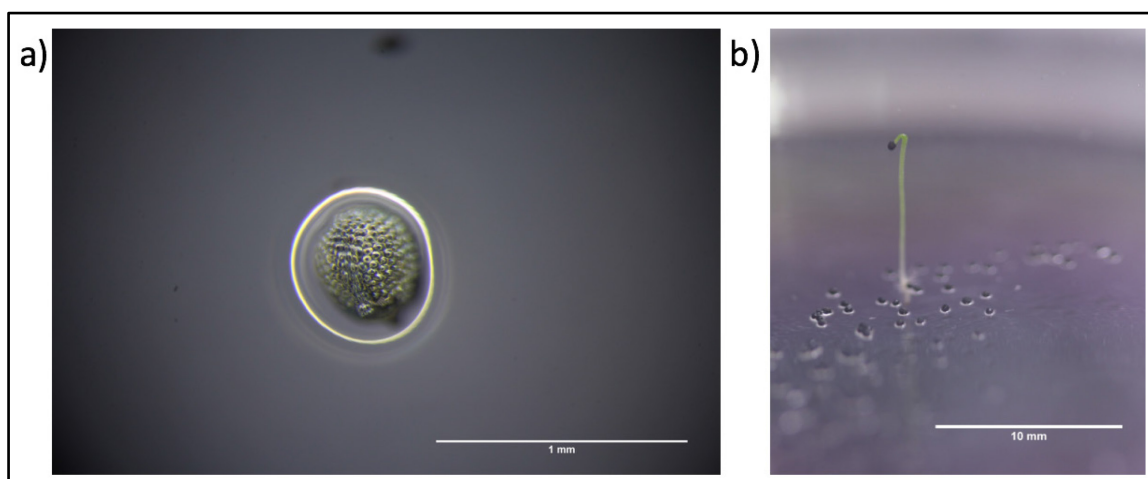
Kultivace rostlin z této podčeledi se nezdařila. Z žádného ze zvolených druhů nebyl odebrán materiál na žádnou z plánovaných analýz; vzhledem ke klíčivosti nedosahující ani 1 % vysetých semen nebylo možné statisticky testovat úspěšnost jednotlivých kultivačních pokusů. U zvolených druhů se pravděpodobně nepodařilo najít stimul, který narušuje dormanci semen, nebo byla semena částečně, nebo úplně neživotoschopná.

4.1.8.1 *Hypoxis hemerocallidea*

U druhu *Hypoxis hemerocallidea* nedošlo k vyklíčení ani jednoho semene, ač bylo provedeno celkem 8 různých pokusů o jeho kultivaci, lišících se použitým médiem, způsobem sterilizace a kultivační teplotou (viz kapitola 3.6.). Osemení je velice pevné, černé a na povrchu hladké a lesklé. Poměrně dobře je odstranitelné pomocí svěráku, ačkoliv jsou semena pro tuto techniku poměrně malá a toto ošetření je tak poměrně pracné. Část semen se tímto způsobem skarifikace také ztratí, jelikož při přílišném utažení svěráku se semeno poškodí.

4.1.8.2. *Hypoxis decumbens*

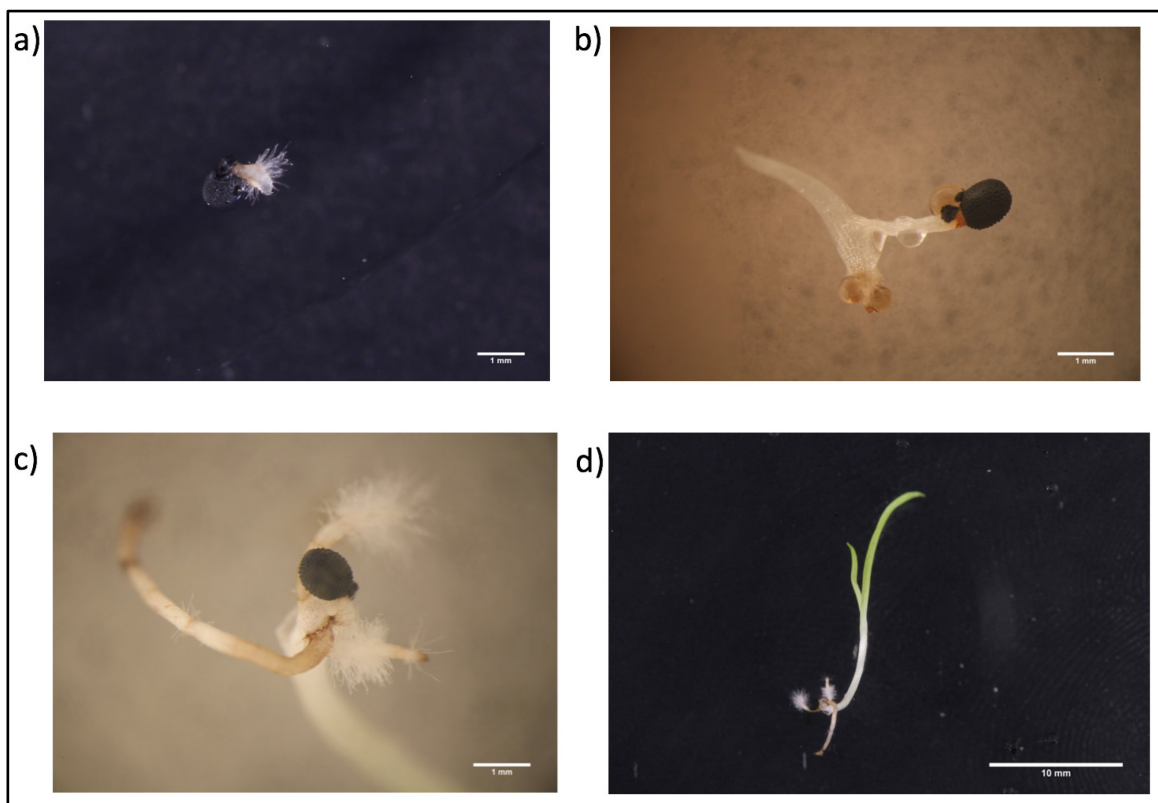
U tohoto druhu vyklíčilo v rámci tří kultivačních pokusů alespoň několik semen, a tak byla zdokumentována podoba časných vývojových stádií tohoto druhu. Osemení bylo nejprve protrženo primárním kořenem. Klíčení tohoto druhu pravděpodobně probíhá epigeicky – semeno je vynášeno prýtem směrem opačným oproti směru gravitačního vektoru. První útvar vznikající během klíčení není jako u orchidejí protokorm, ale kořen a prýt (obrázek 4.7. b). Prýt má na svém vrcholu dobře zřetelný apikální háček. Fotodokumentace viz obrázek 4.7. Mírně vyšší klíčivost byla zaznamenána na médiu BM1. Osemení semen je bradavičnaté a černé (obrázek 4.7. a). Osemení není možné odstranit pomocí svěráku, semena jsou pro tuto techniku příliš malá. U těchto semen se relativně osvědčila skarifikace chemická chlornanem vápenatým.



Obrázek 4.7. Semeno (a) a klíčící rostlinka (b) druhu *H. decumbens* kultivovaných 2,5 měsíce na médiu BM1

4.1.8.3. *Pauridia capensis*

U tohoto druhu vyklíčilo několik semen v celkem sedmi kultivačních pokusech. Mírné zvýšení klíčivosti bylo pozorováno po šesti týdnech kultivace při nižší teplotě (13 °C), přesto však byla velice nízká. Mírně vyšší klíčivost též byla zaznamenána na médiu BM1. Rostliny se vyvíjely velice nestandardně. U semen sice nejprve prorazil osemení primární kořen (obrázek 4.8. a). Na tomto záhy vznikly kořeny postranní (obrázek 4.8. c). Před tvorbou postranních kořenů se ale někdy nejprve vytvořil útvar do určité míry podobný protokormu orchidejí (obrázek 4.8. b). Teprve z tohoto útvaru se vytvořil prýt a osemení tak není prýtem vynášeno nahoru (obrázek 4.8. d). Prýt se vytvořil pouze u dvou rostlinek, u většiny rostlinek vznikly pouze kořeny. Semena jsou kryta bradavičnatým černým osemením, které není možné odstranit svěrákem, ani zmáčknutím pinzetou. Ošetření smirkovým papírem také nepřineslo vyšší klíčivost. Ani chemická skarifikace nevedla k výraznému zvýšení klíčivosti.



Obrázek 4.8. Klíčení semen druhu *P. capensis* kultivovaných po dobu přibližně 8 měsíců na médiích BM1(a, d) a SMS (b, c): a) klíčící semeno, primární kořen proráží osemení; b) z primárního kořene se vyvíjí útvar podobný protokormu; c) jiná rostlinka s již vyvinutými laterálními kořeny; d) jiná, vyvinutá rostlinka s prýtem a kořeny

4.2. Histolokalizace trehalázové aktivity

U všech druhů zahrnutých do této analýzy byla prokázána silná závislost mezi přítomností trehalázové aktivity a přítomností houbových smotků.

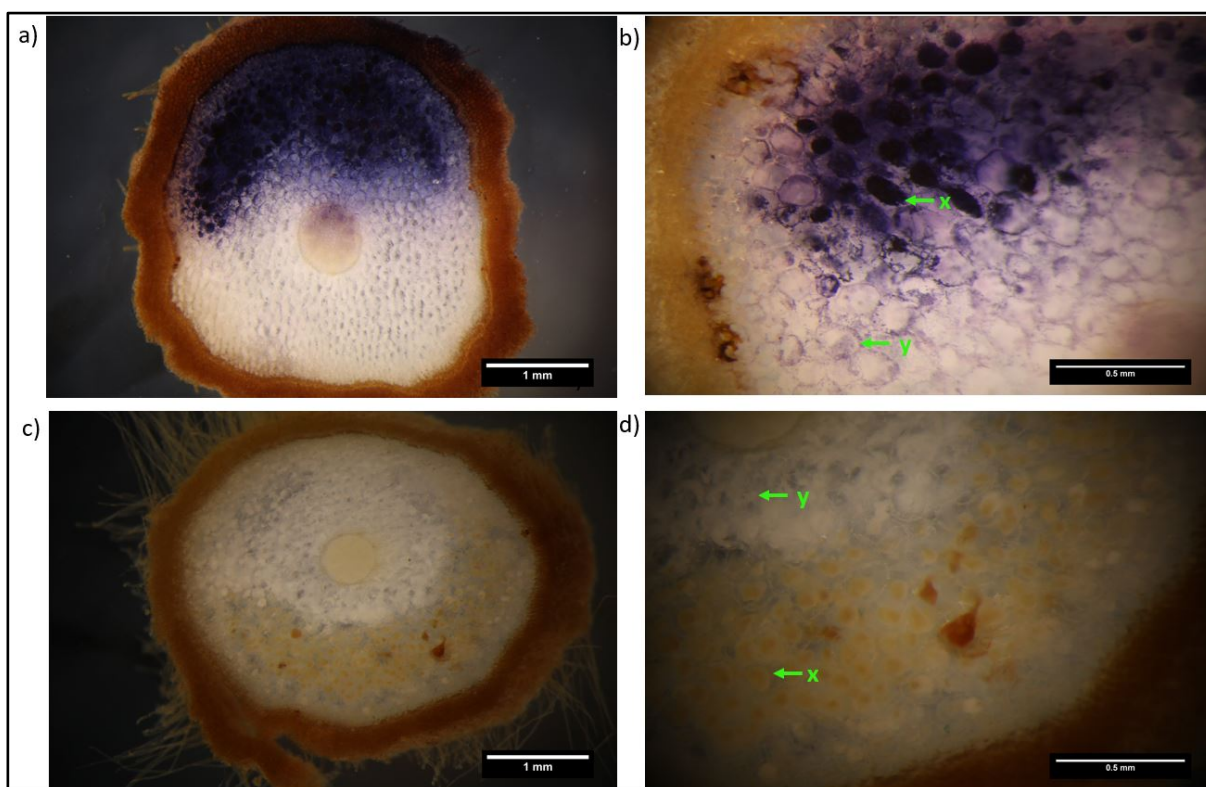
4.2.1 Výsledky histolokalizace trehalázové aktivity

4.2.1.1. *Paphiopedilum purpuratum*

U druhu *P. purpuratum* byla prokázána statisticky velice významná závislost mezi přítomností houbového smotku a trehalázovou aktivitou. U negativní kontroly nebylo pozorováno žádné barvení vizualizující trehalázovou aktivitu (viz obrázek 4.9. c, d). Trehalázová aktivita byla nejvýraznější v buňkách obsahujících smotky a v jejich přímém okolí. Obzvláště pak u buněk s velkými smotky. Síla zbarvení zpravidla klesala se vzdáleností od oblasti se smotky. Smotky samotné byly zpravidla silně obarvené (obrázek 4.9. b). U tohoto druhu byly často obarveny i oblasti bez smotků, ale méně výrazně. Silné zbarvení bylo zpravidla pozorovatelné i u středního válce kořene, s maximem v oblasti cévních svazků. Na některých řezech byly obarveny i kořenové vlásky, výjimečně i části rhizodermis a exodermis. Výsledky jsou zaznamenány v tabulce 4.32. (která je zároveň čtyřpolní tabulkou). U kontrolní varianty byla obarvena pouze jedna oblast jednoho z devíti řezů. Fotodokumentace viz obrázek 4.9.

		obarvení		SUMA	p-hodnota
přítomnost smotku		ANO	NE		<1 × 10 ⁻⁶
	ANO	126	6	132	
	NE	100	59	159	
SUMA		226	65	2	

Tabulka 4.32. Histolokalizace trehalázové aktivity v mykorhizních kořenech druhu *P. purpuratum*. Čtyřpolní tabulka; statistická analýza byla provedena pomocí Fisherova exaktního testu s Yatesovou korekcí na spojitost,), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.



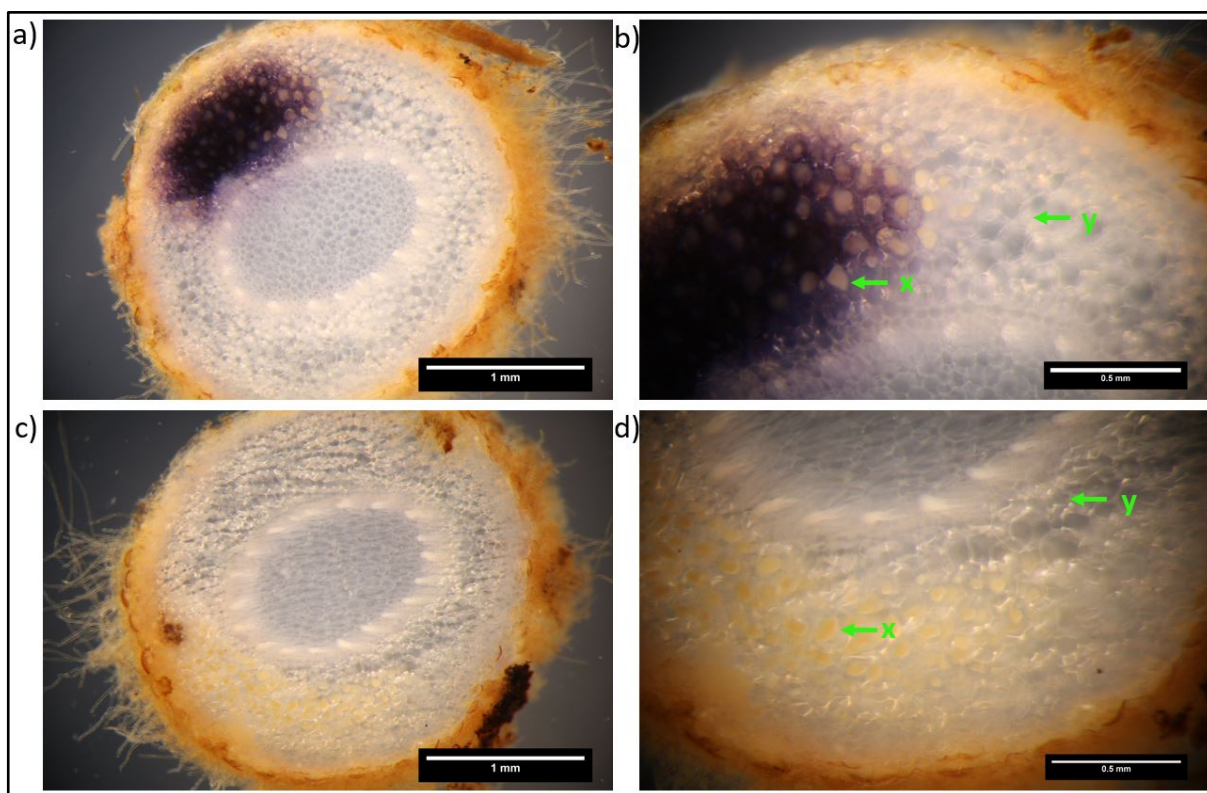
Obrázek 4.9. Histolokalizace trehalázové aktivity v příčných řezech mykorhizními kořeny druhu *P. purpuratum*; barevný produkt vizualizuje trehalázovou aktivitu; a) přítomnost barevného produktu je vázána na oblast s houbovými smotky; b) jiný řez při větším zvětšení, houbové smotky (x) kolokalizují s trehalázovou aktivitou, samotné smotky jsou silně obarveny, oblast bez mykorhizy (y) má mírnou trehalázovou aktivitu; c) negativní kontrola, není pozorovatelný žádný barevný produkt; d) stejný řez při větším zvětšení, smotky ani jejich okolí nejsou obarveny

4.2.1.2. *Ludisia discolor*

U druhu *L. discolor* byla prokázána statisticky velice významná závislost mezi trehalázovou aktivitou a přítomností houbových smotků v kořeni. Smotky samotné zpravidla nebyly obarvené (obrázek 4.10. b), nicméně obarvení formazanem bylo jen vzácně pozorovatelné mimo mykorhizované oblasti kořene. U negativní kontroly nebylo pozorováno žádné barvení (obrázek 4.10. c, d). Výsledky jsou zaznamenány v tabulce 4.33., fotodokumentace viz obrázek 4.10.

		obarvení		SUMA	p-hodnota
přítomnost smotku		ANO	NE		<1 × 10 ⁻⁶
	ANO	46	17	63	
	NE	8	142	150	
SUMA		54	159	213	

Tabulka 4.33. Histolokalizace trehalázové aktivity v mykorhizních kořenech druhu *L. discolor*. Čtyřpolní tabulka; statistická analýza byla provedena pomocí Fisherova exaktního testu s Yatesovou korekcí na spojitost, hladina významnosti $\alpha = 0,05$.



Obrázek 4.10. Histolokalizace trehalázové aktivity v příčných řezech mykorhizními kořeny druhu *L. discolor*, barevný produkt vizualizuje trehalázovou aktivitu; a) přítomnost barevného produktu je vázána na oblast s houbovými smotky; b) stejný řez při větším zvětšení, houbové smotky (x) kolokalizují s trehalázovou aktivitou, samotné smotky však obarveny nejsou, oblast bez mykorhizy (y) nemá pozorovatelnou trehalázovou aktivitu; c) negativní kontrola, není pozorovatelný žádný barevný produkt; d) stejný řez při větším zvětšení, smotky ani jejich okolí nejsou obarveny

4.2.1.3. *Disa tripetaloides*

U tohoto druhu byla prokázána statisticky velice významná závislost mezi trehalázovou aktivitou a přítomností houbových smotků. Trehalázová aktivita vizualizovaná barevným produktem však byla většinou pozorovatelná i v nepřítomnosti houbových smotků, výrazně více ale byly barveny oblasti se smotky a smotky samotné (obrázek 4.11. a, b). Jen velmi výjimečně nebyly oblasti se smotky obarveny. Výsledky jsou zaznamenány v tabulkách 4.34. a 4.35. a zdokumentovány na obrázku 4.11.

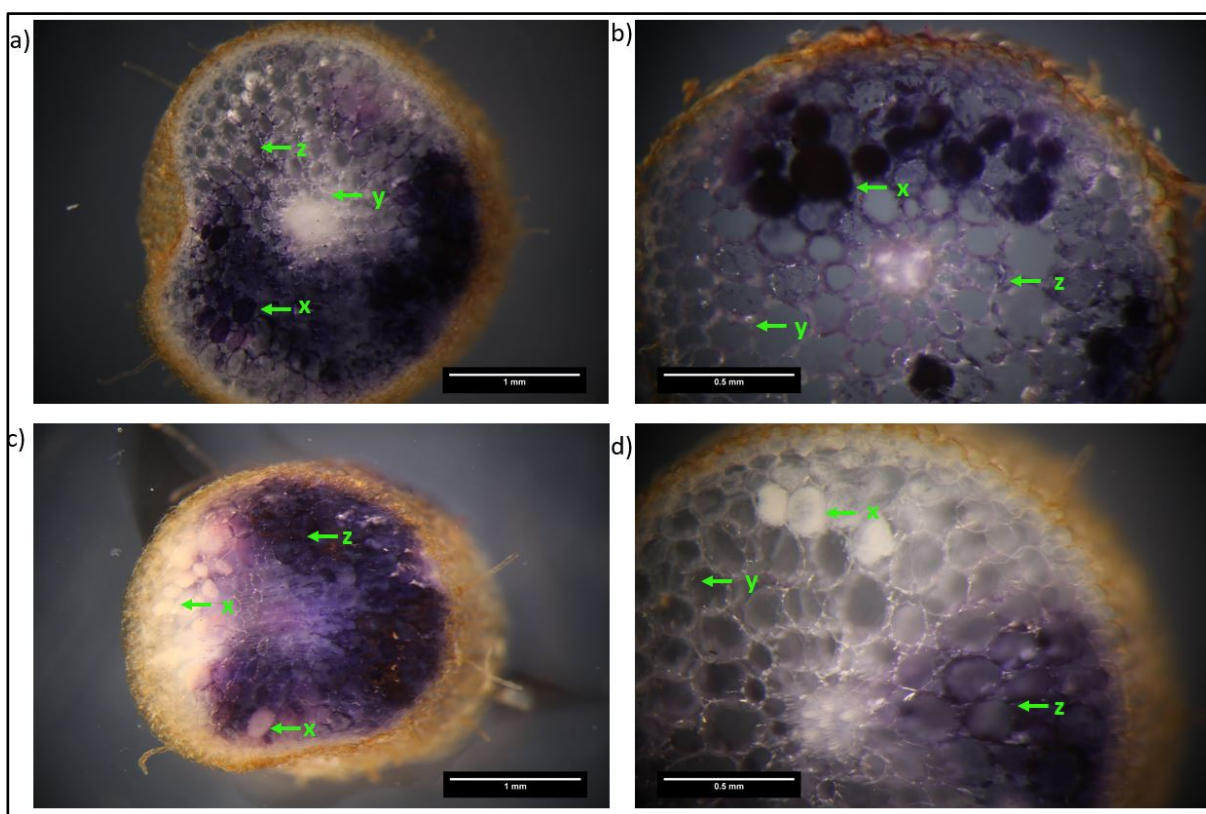
U tohoto druhu selhala negativní kontrola. Většina řezů negativní kontroly byla obarvena (obrázek 4.11 c, d). V tomto případě ale nebyla prokázána statisticky významná závislost mezi přítomností houbových smotků a trehalázovou aktivitou. Důvod není zřejmý, ale například přítomnost některých mikroorganismů by mohla vést k falešně pozitivní reakci, například vlivem štěpení strukturních polysacharidů. Experiment proto bude vhodné zopakovat na novém materiálu.

		obarvení		SUMA	p-hodnota
přítomnost smotku		ANO	NE		$<1 \times 10^{-6}$
	ANO	72	5	77	
	NE	59	53	112	
SUMA		131	58	189	

Tabulka 4.34. Histolokalizace trehalázové aktivity v mykorhizních kořenech druhu *D. tripetaloides*. Čtyřpolní tabulka; statistická analýza byla provedena pomocí Fisherova exaktního testu s Yatesovou korekcí na spojitost,), hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

		obarvení		SUMA	p-hodnota
přítomnost smotku		ANO	NE		0,219
	ANO	7	22	29	
	NE	31	48	79	
SUMA		38	70	108	

Tabulka 4.35. Histolokalizace trehalázové aktivity v mykorhizních kořenech druhu *D. tripetaloides*, negativní kontrola. Čtyřpolní tabulka; statistická analýza byla provedena pomocí Fisherova exaktního testu s Yatesovou korekcí na spojitost, hladina významnosti $\alpha = 0,05$.



Obrázek 4.11. Histolokalizace trehalázové aktivity v příčných řezech mykorhizními kořeny druhu *D. tripetaloides*; barevný produkt vizualizuje trehalázovou aktivitu; a) v oblasti se smotky (x) je patrné výrazné barvení formazanem, z oblasti bez smotků je část zbarvena (z) a část nikoli (y); b) větší zvětšení jiného řezu s podobnými vlastnostmi; c) negativní kontrola, v oblasti se smotky (x) není patrné barvení, v oblasti bez smotků (z) je barvení patrné; d) jiný řez negativní kontroly ve větším zvětšení, v oblasti se smotky (x) není patrné bavení, zatímco oblast bez smotku je částečně zbarvena (z) a částečně nikoliv (z)

4.3. Sekvenace trehalázových genů

V tomto experimentu (DNA1) byla ze všech vybraných druhů úspěšně vyizolována genomová DNA z pletiv dospělých rostlin a pro téměř všechny druhy byl získán PCR produkt namnožené trehalázové sekvence. Všechny vhodné PCR produkty byly připraveny pro sekvenaci do bodu odsolení ligačního roztoku (viz kapitola 3.8.4.). Bohužel již z časových důvodů nebylo možné proces dokončit a většina produktů dosud nebyla osekvenována.

4.3.1. Sekvence *Neuwiedia zollingerii*

U druhu *Neuwiedia zollingerii* byla získána sekvence, o které není zřejmé, zda skutečně jde o sekвени trehalázy. Tato sekvence nebyla zařazena do sekvenčního alignmentu (viz kapitola 4.4.). Sekvence byla získána s použitím páru primerů TRE-S-4. Vyizolována byla sekvence dlouhá 431 bazí (viz tabulka 4.36.). Zadání této sekvence do webové aplikace BLAST (2017) a vyhledání podobných sekvencí v databázi „nucleotide collection“ vedla k zajímavému výsledku. Úsek této sekvence dlouhý přibližně 130 bází z 3' konce této sekvence je poměrně významně sekvenčně podobný sekvencím trehaláz z jiných druhů orchidejí – *Phalaenopsis equestris* a *Dendrobium catenatum* (obě z podčeledi Epidendroideae). Dále pak je podobný dalším trehalázovým sekvencím jiných druhů rostlin. Shoda s žádnou jinou, než trehalázovou sekvencí nebyla nalezena. Pro zbylou část sekvence nebyla nalezena shoda s žádnou známou sekvencí.

TGAGCTCGCGTTGCAAAGTTAAATGAGCTTGCGCATGAAGGTGTATGTGAGGATATAAAT
TGATTCTTGGATTATAACTTAAGATCAGTTAGTTACTGGAGATTTGTCAGTTTAAGGTTA
ACTTTGTTTAATCTTAAATTAATTTTTTTGCTAAAAAGAAAAAGTTGCAGTATTATTTT
TAAACCCCTGCACAAATCCCAAATGAAAAGTTTCCTAGAAAGGAAATTTGGGTGTTTT
TTTCTTTAAATAAATTTATATTCAAGTTATCGAACTTCAAACTATTGATGTATTGTAA
ATAGGGATTTTCAAATGGTTGGGCTCCCCTGCAACATCTGATAATTGAAGGATTGGCTA
ATTCTGGTTCAAATCGGCAAGAAATTTGGCTGAGGATATTGCTGTAAGGTGGATAAGAA
CAAACATATGCT

Tabulka 4.36. Sekvence (směr 5' ->3') získaná z genomové DNA druhu *N. zollingerii*

4.4. Fylogeneze trehalázových genů

Prohledáním dostupných databází nukleotidových sekvencí bylo získáno 105 sekvencí v dostatečné délce pro sekvenční alignment. Dalších 14 sekvencí z orchidejí bylo získáno v rámci jiných projektů laboratoře. K založení fylogenetického stromu byly použity sekvence chlorofytních řas *Auxenochlorella protothecoides* a *Ostreococcus taurii*. Zahrnuto bylo celkem 119 sekvencí trehaláz z 83 druhů.

Výsledný alignment obsahoval 1381 parsimonně informativních pozic a 412 variabilních pozic.

Vytvořený fylogenetický strom a sekvenční alignment mají tyto parametry:

a) smallest sum of branch lengths (nejmenší suma délek větví) = 12,692

b) poměr transice : transverze = 1,2684

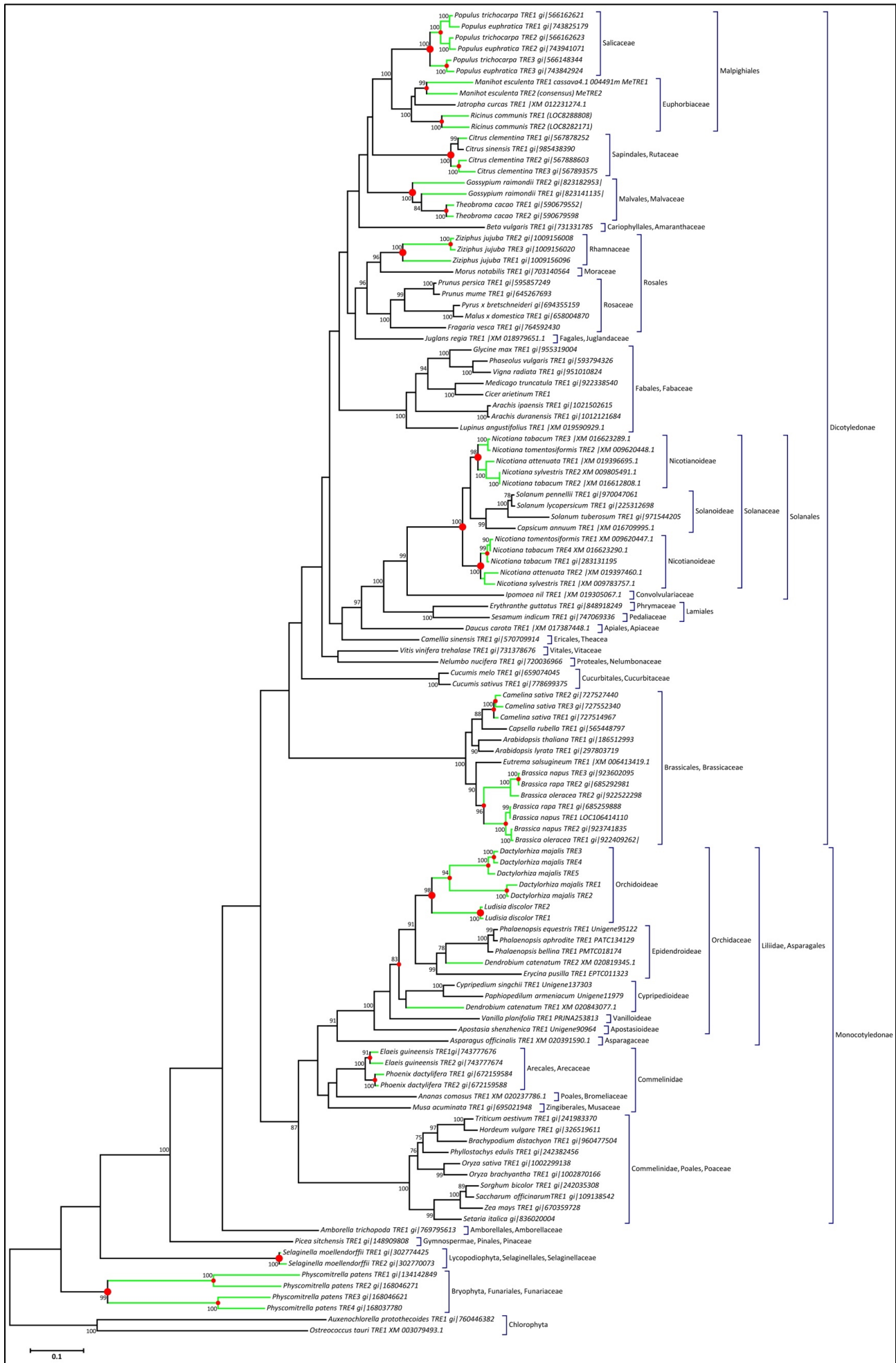
c) Log likelyhood = - 75377,9.

Bylo nalezeno několik duplikací trehalázových genů napříč podříší Embryophyta. Na bázi fylogenetického stromu jsou odděleny bazální taxony Embryophyt, jako Bryophyta a Lycopodiophyta, kde bylo zaznamenáno několik duplikací. Dále byly odděleny nahosemenné a krytosemenné rostliny, kdy u nahosemenných, zastoupených ovšem jediným druhem, nebyla identifikována duplikace. Krytosemenné rostliny byly rozděleny na jednoděložné a dvouděložné, kdy v obou těchto skupinách byla identifikována řada duplikací.

4.4.1. Fylogenetické vztahy sekvencí trehaláz podříše Embryophyta

Zahrnuto bylo celkem 81 druhů z podříše Embryophyta a dva druhy z říše Chlorophyta. U Embryophyt byla identifikována více než jedna trehaláza u 23 druhů (tedy u 28,4 % zahrnutých druhů) a bylo identifikováno celkem 32 duplikací. Z vytvořeného fylogenetického stromu je patrné, že vývoj trehalázových genů přibližně odpovídá fylogenezi Embryophyt (viz obrázek 4.12., ve vysokém rozlišení je fylogenetický strom dostupný na přiloženém CD).

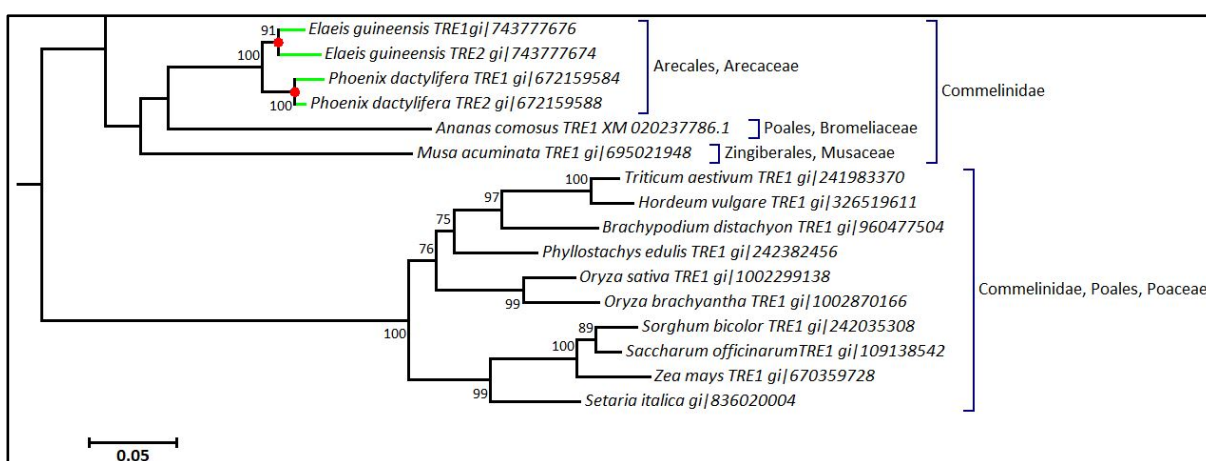
Následující strana: Obrázek 4.12. Fylogenetický strom trehalázových sekvencí podříše Embryophyta zkonstruovaný metodou maximum likelyhood (maximální věrohodnosti) za použití 1000 bootstrapových replikátů. Strom je založen v sekvencích dvou zástupců říše Chlorophyta, *Ostreococcus taurii* a *Auxenochlorella protothecoides*. Sekvence jsou označeny identifikačním číslem z databází NCBI GenBank, *Orchidstra* a *Orchidbase*, a z databáze k článku Han et al. (2016). Červená kolečka značí duplikaci, zelené větve značí dvě a více sekvencí z téhož druhu. Bootstrapová podpora byla zaznamenána pouze pokud byla větší než 75 %. Délka větve odpovídá poměru mezi počtem nukleotidových substitucí a celkovým počtem pozic. Fylogenetický strom ve vysokém rozlišení je dostupný na přiloženém CD.



Na samé bázi stromu, vyjma chlorofytních řas sloužících jako outgroup, je oddělená větev s nízkou bootstrapovou podporou, která odpovídá nadoddělení Bryophyta. Do této skupiny byly zařazeny sekvence z druhu čepenka *Physcomitrella patens*, kde byly identifikovány dobře oddělené dvě větve odpovídající duplikaci (bootstrapová podpora 99 %). V každé ze dvou větví u *P. patens* potom došlo k další duplikaci (podpora 100 %, sekvence TRE1, 2, 3 a 4). Oddělení Lycopodiophyta zde bylo zastoupeno sekvencemi vranečku *Selaginella moellendorffii*. U *S. moellendorffii* byly identifikovány dvě dobře oddělené větve (bootstrapová podpora 100%, TRE1 a TRE2). Z nahosemenných rostlin se podařilo nalézt jen jednu sekvenci, z borovice *Pinus sitchensis*, která se zde oddělila na bázi semenných rostlin (Spermatophyta). Na bázi krytosemenných rostlin (Magnoliophyta) byla s nízkou bootstrapovou podporou oddělena sekvence druhu *Amborella trichopoda* od zbytku krytosemenných. Jednoděložné (Monocotyledonae) byly od dvouděložných (Dicotyledonae) odděleny také s nízkou bootstrapovou podporou.

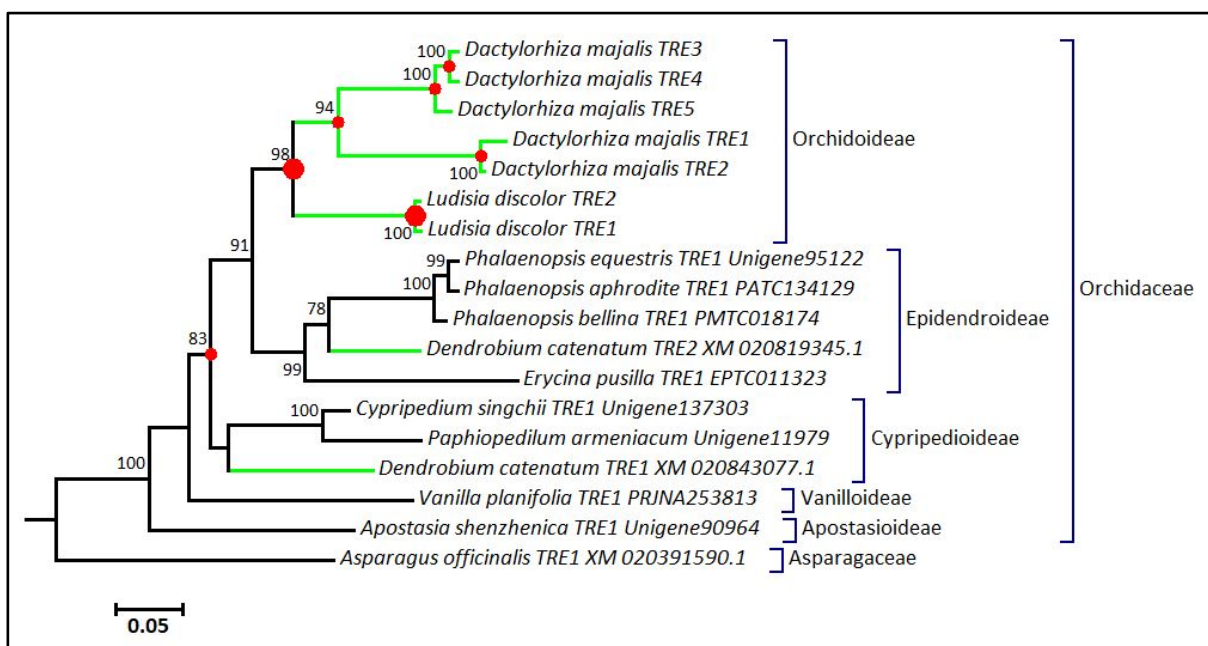
V rámci jednoděložných došlo v modelu k vnoření skupiny Liliidae do skupiny Commelinidae. V rámci větve reprezentující skupinu Commelinidae dohromady s Liliidae jsou tak odděleny s bootstrapovou podporou 87 % dvě větve, jedna zahrnující řád Poales, a druhá zahrnující dohromady řády Asparagales (který se standardně řadí do skupiny Liliidae), Zingiberales, Arecales.

V rámci řádu Poales, který je zde reprezentován sekvencemi z 10 rostlin pouze z čeledi Poaceae, s největší pravděpodobností k duplikaci trehalázového genu nedošlo. Naopak v řádu Arecales reprezentovaného zde sekvencemi z rostlin z čeledi Arecaceae došlo pravděpodobně k duplikaci trehalázového genu ještě před oddělením zahrnutých druhů palmy *Elaeis guineensis* a datlovníku *Phoenix dactylifera*. K této duplikaci pravděpodobně došlo až po oddělení řádů Arecales a Zingiberales, jelikož jediná trehalázová sekvence banánovníku *Musa acuminata* vytváří samostatnou větev bazální vůči sekvencím z řádu Arecales. V rámci této větve je navíc na bázi oddělena větev sekvence druhu ananasovníku *Ananas comosus*, který se standardně řadí do řádu Poales, do čeledi Bromeliaceae. Vizualizace viz obrázek 4.13.



Obrázek 4.13. Část fylogenetického stromu znázorňující fylogenezi trehalázových genů ve skupině Commelinidae. Červená kolečka značí duplikaci, zelené větve značí dvě a více sekvencí z téhož druhu. Maximum likelyhood metoda, 1000 bootstrapových replikátů. Bootstrapová podpora zaznamenána pouze pokud byla větší než 75 %. Délka větve odpovídá poměru mezi počtem nukleotidových substitucí a celkovým počtem pozic.

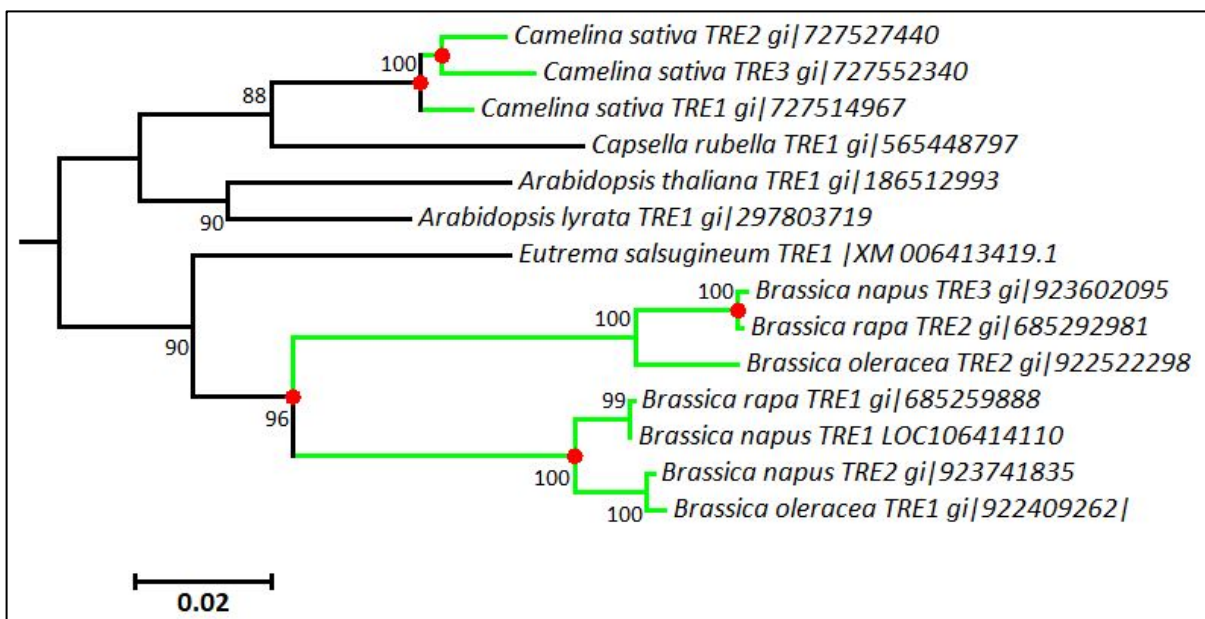
Do větve odpovídající skupině Liliidae byly zařazeny sekvence druhů z řádu Asparagales, konkrétně druhu chřestu *Asparagus officinalis* z čeledi Asparagaceae a 11 druhů z čeledi Orchidaceae. Tyto dvě čeledi byly odděleny s bootstrapovou podporou 91 %. Na bázi čeledi Orchidaceae byla s bootstrapovou podporou 100 % oddělena větev představovaná sekvencí trehalázy z druhu *Apostasia shenzhenica* z podčeledi Apostasioideae. Druhá větev tohoto uzlu představuje další zařazené sekvence z odvozenějších taxonů orchidejí. S nízkou bootstrapovou podporou se od dalších sekvencí oddělila sekvence druhu z podčeledi Vanilloideae vanilky *Vanilla planifolia*. Dále byly rozděleny s bootstrapovou podporou 83 % sekvence druhů z podčeledi Cypripedioideae, ze které byly zastoupeny druhy *Paphiopedilum armeniacum* a *Cypripedium singchii*. Do této větve byla zařazena také jedna sekvence ze dvou sekvencí z druhu stromobytce *Dendrobium catenatum* (TRE1), který se ovšem standardně řadí do podčeledi Epidendroideae. Toto zařazení by mohlo ukazovat na duplikaci před oddělením podčeledí Cypripedioideae a podčeledí Orchidoideae a Epidendroideae. Od sekvencí druhů z podčeledi Cypripedioideae byla s bootstrapovou podporou 83 % oddělena větev obsahující sekvence druhů z podčeledi Epidendroideae: *Erycina pusilla*, *Dendrobium catenatum*, *Phalaenopsis bellina*, *Phalaenopsis equestris* a *Phalaenopsis aphrodite*. Na bázi podčeledi Epidendroideae byla s bootstrapovou podporou 99 % oddělena sekvence druhu *E. pusilla*. Z tohoto uzlu se odděluje větev rozdělující se s bootstrapovou podporou 78 % v jednu větev obsahující druhou sekvenci druhu stromobytce *D. catenatum* (TRE2) a větev obsahující sekvence druhů rodu *Phalaenopsis*. Od podčeledi Epidendroideae byla s bootstrapovou podporou oddělena větev se sekvencemi druhů z podčeledi Orchidoideae s bootstrapovou podporou 91 %. Zde jsou na bázi odděleny větve obsahující sekvence druhů *Ludisia discolor* a prstnatce (*Dactylorhiza*) (bootstrapová podpora 98 %). U obou druhů došlo k duplikacím, ale k těm zjevně došlo až po oddělení rodů *Ludisia* a *Dactylorhiza*. Zatímco u *L. discolor* byly nalezeny pouze dvě sekvence, u prstnatce *D. majalis* bylo identifikováno 5 paralogů, které se dělí do dvou hlavních větví (bootstrapová podpora 94 %). Jedna tato větev obsahuje dvě sekvence a druhá tři sekvence trehalázového genu (vše s bootstrapovou podporou 100 %). Ze všech zahrnutých druhů tak bylo právě u *D. majalis* zaznamenáno nejvíce kopií trehalázových genů v rámci podříše Embryophyta. Vizualizace viz obrázek 4.14.



Obrázek 4.14. Část fylogenetického stromu znázorňující fylogenezi trehalázových genů i ve skupině Liliidae. Červená kolečka značí duplikaci, zelené větve značí dvě a více sekvencí z téhož druhu. Maximum likelihood metoda, 1000 bootstrapových replikátů. Bootstrapová podpora zaznamenána pouze pokud byla větší než 75 %. Délka větve odpovídá poměru mezi počtem nukleotidových substitucí a celkovým počtem pozic.

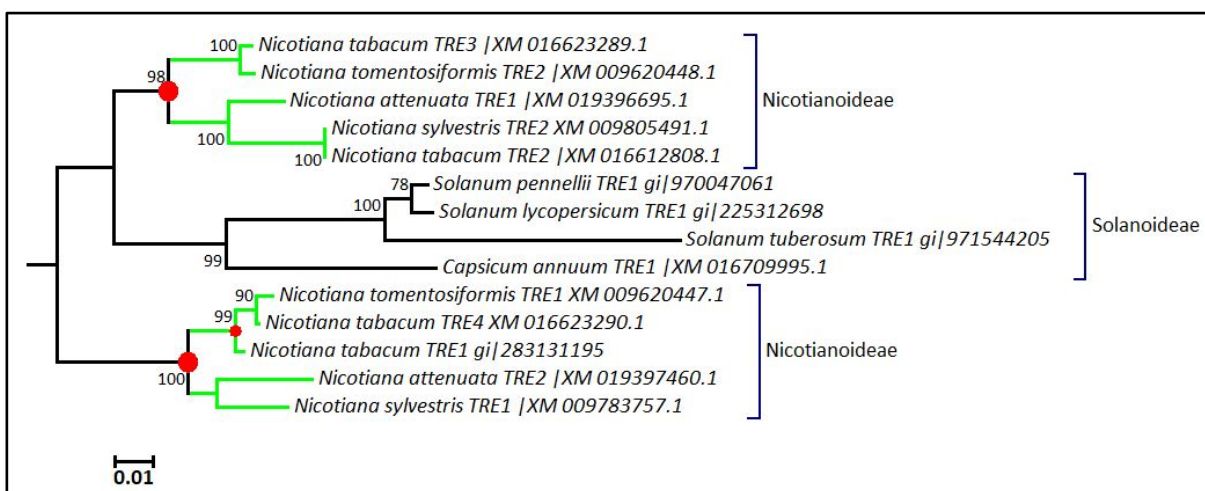
V rámci dvouděložných rostlin došlo v modelu k oddělení dvou větví s nízkou bootstrapovou podporou, které pravděpodobně odpovídají skupinám Eurosids I (Fabideae) a Eurosids II (Malvidae), ovšem s řadou velkých odlišností. Některé taxony, které mají spadat do Eurosids I byly zařazeny na základě trehalázových sekvencí do větve, která by měla odpovídat skupině Eurosids I (rody kakaovník – *Theobroma* a bavlník – *Gossypium*). Bazální dvouděložné a Asterids byl také zařazený modelem do větve podobné Eurosids I (např. řád Caryophyllales, kam patří druh řepy *Beta vulgaris*). V následující části popisu výsledků proto upustím od takto širokého taxonomického rámce a omezím se především na řády a čeledi.

Eurosids II zde reprezentují sekvenční rostlin z čeledi Brassicaceae. U většiny druhů z této čeledi byla zaznamenána jen jedna sekvenční trehalázy. Ovšem u všech třech zahrnutých druhů rodu brukve (*Brassica*) byly nalezeny minimálně dvě sekvenční trehalázy (TRE1 a TRE2). Tyto sekvenční vytváří dvě hluboce oddělené skupiny (bootstrapová podpora 96 %) a k této duplikaci tedy pravděpodobně došlo ještě před oddělením těchto třech druhů. U druhu brukve *Brassica napus* došlo ještě k jedné duplikaci (bootstrapová podpora 100 %, TRE2 a TRE3), takže u něj byly identifikovány tři trehalázy. U dalšího druhu z této čeledi, lněčky *Camelina sativa*, byly zaznamenány dvě duplikace trehalázového genu nezávislé na duplikacích u rodu *Brassica*. Vizualizace viz obrázek 4.15.



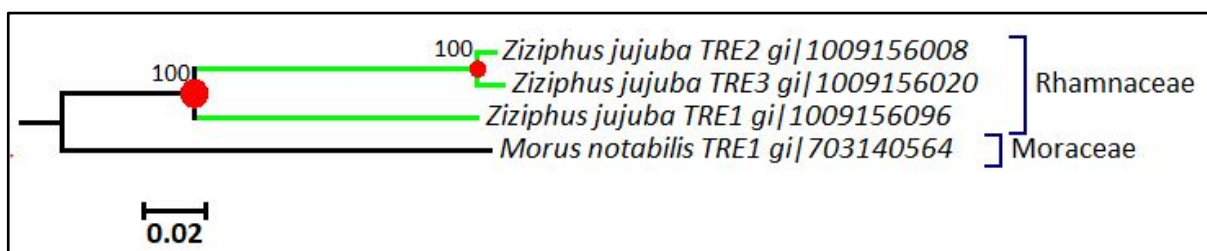
Obrázek 4.15. Část fylogenetického stromu znázorňující fylogenezi trehalázových genů v čeledi Brassicaceae. Červená kolečka značí duplikaci, zelené větve značí dvě a více sekvencí z téhož druhu. Maximum likelihood metoda, 1000 bootstrapových replikátů. Bootstrapová podpora zaznamenána pouze pokud byla větší než 75 %. Délka větve odpovídá poměru mezi počtem nukleotidových substitucí a celkovým počtem pozic.

U řádu Cucurbitales byly zastoupeny druhy okurky *Cucumis melo* a *Cucumis sativus*, oba s jen jednou nalezenou sekvencí trehalázy. U čeledi Solanaceae reprezentované zde několika druhy rodu tabák – *Nicotiana* (podčeleď Nicotianoideae), lilek – *Solanum* a jedním druhem papriky *Capsicum annuum* (podčeleď Solanoideae) je situace poněkud složitější. S bootstrapovou podporou 100 % zde byly odděleny dvě větve sekvencí trehalázy rodu tabák, které zjevně odrážejí duplikaci předcházející oddělení jednotlivých druhů. V jedné modelem vytvořené větvi je od každého zahrnutého druhu rodu *Nicotiana* zařazena jedna sekvence, kromě druhu *N. tabacum*, u kterého zde pravděpodobně došlo k další nezávislé duplikaci (TRE1 a TRE4). Ve druhé oddělené větvi jsou odděleny do dvou větví (bootstrapová podpora 76 %) sekvence rodu *Nicotiana* od dalších zahrnutých druhů z čeledi Solanaceae. To může naznačovat, že k duplikaci došlo ještě před oddělením zahrnutých podčeledí a v podčeledi Solanoideae došlo ke ztrátě přebytečné kopie. Vzhledem k nízké bootstrapové podpoře je ale možné, že pozorovaná duplikace je specifická pro *Nicotianoideae*. Sekvence druhu *Nicotiana tabacum* TRE2 a TRE3 jsou přiřazené k různým druhům tabáků, což nejspíše odráží jeho alopolyploidní původ. Vizualizace viz obrázek 4.16.



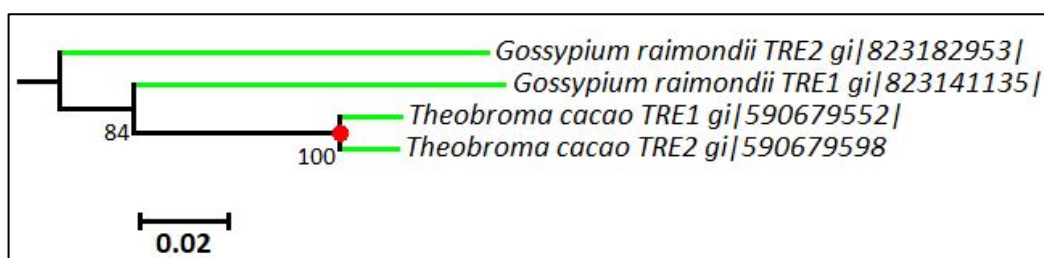
Obrázek 4.16. Část fylogenetického stromu znázorňující fylogenezi trehalázových genů v čeledi Solanaceae. Červená kolečka značí duplikaci, zelené větve značí dvě a více sekvencí z téhož druhu. Maximum likelihood metoda, 1000 bootstrapových replikátů. Bootstrapová podpora zaznamenána pouze pokud byla větší než 75 %. Délka větve odpovídá poměru mezi počtem nukleotidových substitucí a celkovým počtem pozic.

Kromě čeledi Solanaceae byla z řádu Solanales zahrnuta i jedna sekvence z čeledi Convolvulariaceae, z druhupovijnice *Ipomoea nil*, kde k žádné duplikaci pravděpodobně nedošlo. Z řádu Lamiales byly zastoupeny dva druhy – kejklička *Erytranthe guttatus* (čeleď Phrymaceae) a sezam *Sesamum indicum* (čeleď Pedaliaceae). V rámci tohoto řádu nebyla zaznamenána duplikace. Z řádu Apiales byl zastoupen jen druh mrkev *Daucus carota* z čeledi Apiaceae. Zde patrně k duplikaci také nedošlo. Z řádu Ericales byla zastoupena čeleď Theaceae druhem čajovníku *Camelia sinensis*; ani zde nebyla zaznamenána duplikace. Řády Solanales, Apiales a Ericales spadají do skupiny Asterid, která je v tomto modelu s nízkou bootstrapovou oddělena od ostatních dvouděložných. Řád Fabales byl zastoupen sekvencemi z 8 druhů rostlin z čeledi Fabaceae. V této čeledi patrně k duplikaci nedošlo. U řádu Vitales zastoupeného druhem révy *Vitis vinifera* byla nalezena jen jedna sekvence trehalázy. Bazální taxon dvouděložných, řád Proteales, byl zastoupen druhem lotosu *Nelumbo nucifera*, u kterého byla nalezena jen jedna sekvence trehalázy. Další větev je tvořena z části sekvencemi druhů z řádu Rosales. Tento řád byl v modelu rozdělen bootstrapovou podporou na větev zahrnující čeleď Rosaceae a větev obsahující čeledi Moraceae a Rhamnaceae. V rámci čeledi Rosaceae nebyla zaznamenána žádná duplikace trehalázového genu. V rámci čeledi Rhamnaceae byly zaznamenány dvě duplikace u druhu cícimku *Ziziphus jujuba*. Tyto duplikace pravděpodobně proběhly po oddělení čeledi Rhamnaceae od čeledi Moraceae, kde k duplikaci alespoň u druhu moruše *Morus notabilis* pravděpodobně nedošlo. Vizualizace viz obrázek 4.17.



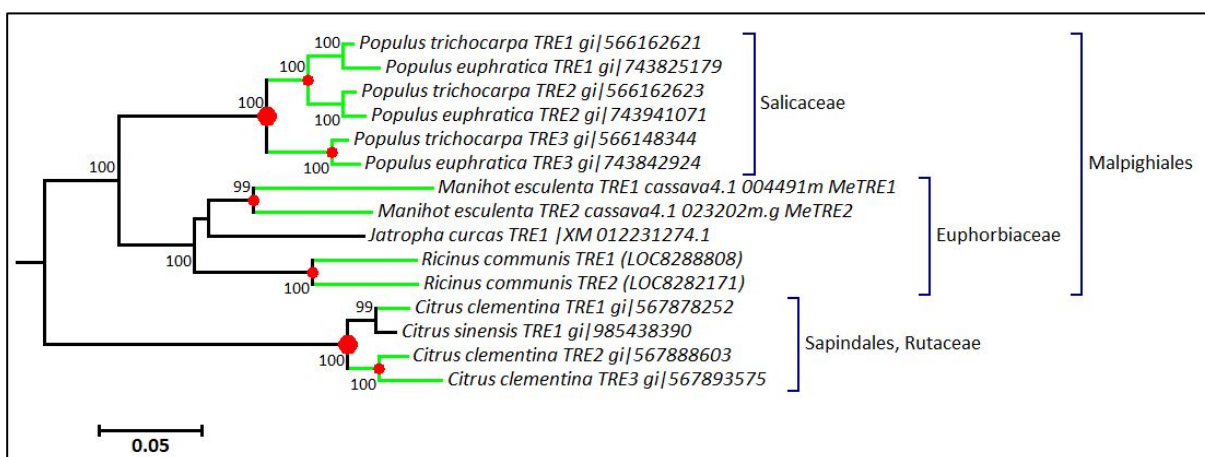
Obrázek 4.17. Část fylogenetického stromu znázorňující fylogenezi trehalázových genů v čeledi Moraceae a Rhamnaceae. Červená kolečka značí duplikaci, zelené větve značí dvě a více sekvencí z téhož druhu. Maximum likelihood metoda, 1000 bootstrapových replikátů. Bootstrapová podpora zaznamenána pouze pokud byla větší než 75 %. Délka větve odpovídá poměru mezi počtem nukleotidových substitucí a celkovým počtem pozic.

Z řádu Fagales byl zastoupen druh ořešáku *Juglans regia* z čeledi Juglandaceae. U tohoto druhu byla nalezena jen jedna sekvenze trehalázy. Řád Caryophyllales byl zastoupen čeledí Amaranthaceae druhem řepy *Beta vulgaris* s jednou identifikovanou trehalázovou sekvencí. Řád Malvales byl zastoupen čeledí Malvaceae, kde byly nalezeny sekvenze trehaláz dvou druhů. U druhu bavlníku *Gossypium raimondii* došlo pravděpodobně k duplikaci, kdy dvě nalezené sekvenze (TRE1 a TRE2) byly modelem rozděleny do dvou větví s bootstrapovou podporou 100 %. Vizualizace viz obrázek 4.18.



Obrázek 4.18. Část fylogenetického stromu znázorňující fylogenezi trehalázových genů v čeledi Malvaceae. Červená kolečka značí duplikaci, zelené větve značí dvě a více sekvencí z téhož druhu. Maximum likelihood metoda, 1000 bootstrapových replikátů. Bootstrapová podpora zaznamenána pouze pokud byla větší než 75 %. Délka větve odpovídá poměru mezi počtem nukleotidových substitucí a celkovým počtem pozic.

U druhu kakaovníku *Theobroma cacao* došlo také k duplikaci, která byla pravděpodobně nezávislá na duplikaci u druhu *G. raimondii*. Řád Sapindales byl zastoupen dvěma druhy rodu citroník – *Citrus* (čeleď Rutaceae). U druhu citroníku *Citrus sinensis* byla nalezena jen jedna sekvenze, U druhu citroníku *Citrus clementina* byly ovšem nalezeny tři trehalázové sekvenze vzniklé dvěma duplikacemi. Patrně tak v rámci rodu *Citrus* došlo k duplikaci nezávisle. Od zbytku dvouděložných rostlin byla s nízkou bootstrapovou podporou oddělena větev reprezentující řád Malpighiales zastoupený čeleděmi Euphorbiaceae a Salicaceae. V rámci čeledi Euphorbiaceae patrně došlo k několika nezávislým duplikacím. Sekvenze druhu skočce *Ricinus communis* a druhu manioku *Manihot esculenta* byly s bootstrapovou podporou 100 % odděleny vždy do dvou větví. U obou druhů tak patrně došlo k jedné duplikaci až po oddělení těchto rodů. U čeledi Salicaceae došlo patrně ke dvěma duplikacím před oddělením druhů topolu *Populus trichocarpa* a *Populus euphratica* (oba uzly s bootstrapovou podporou 100 %). Vizualizace viz obrázek 4.19.



Obrázek 4.19. Část fylogenetického stromu znázorňující fylogenezi trehalázových genů v čeledích Rutaceae, Euphorbiaceae a Salicaceae. Červená kolečka značí duplikaci, zelené větve značí dvě a více sekvencí z téhož druhu. Maximum likelihood metoda, 1000 bootstrapových replikátů. Bootstrapová podpora zaznamenána pouze pokud byla větší než 75 %. Délka větve odpovídá poměru mezi počtem nukleotidových substitucí a celkovým počtem pozic.

5. Diskuze

Mykorhizní symbióza je zcela esenciální součástí života orchidejí a také naprosté většiny ostatních rostlin. Z tohoto důvodu je velice podstatné klást si otázku, jakým způsobem probíhá komunikace a výměna látek mezi symbionty v orchideoidní mykorhize. Tato práce se konkrétně zaměřuje na možnou úlohu trehalózy v této symbióze. Nutným předpokladem pro přenos trehalózy směrem z houbového do rostlinného symbionta je zajisté schopnost rostlinného symbionta nejen tolerovat exogenní trehalózu, ale též jeho schopnost trehalózu využít jako výhradní zdroj uhlíku a energie. Tato problematika proto bude diskutována jako první. Jelikož jsou orchideje velice diverzifikovaná skupina rostlin, klade si tato práce zároveň za cíl umístit potenciální schopnost orchidejí do evolučního rámce. Z toho důvodu byly do experimentů zařazeny druhy z oddělených vývojových skupin orchidejí a také druhy z orchidejím blízce příbuzné čeledi Hypoxidaceae. Zahrnuté druhy budou diskutovány každý zvlášť, aby byl obraz situace u každého druhu celistvý, a aby byl využit potenciál všech měřených parametrů.

Logickým předpokladem toho, že látkou přenášenou v orchideoidní mykorhize je trehalóza, a že tato je orchidejí využívána, je zvýšená trehalázová aktivita na fyzickém rozhraní mezi symbionty. Výsledky experimentů zaměřených na tuto hypotézu budou diskutovány v další kapitole. Vzhledem k tomu, že enzym trehaláza je pravděpodobně důležitým činitelem nejen v OrM, ale i v metabolismu trehalózy u všech rostlin, bude diskutována fylogeneze trehalázových genů v rámci podříše Embryophyta, sestavená na základě sekvenčního alignmentu.

5.1. Utilizace trehalózy protokormy orchidejí

V odborné literatuře bývá velice často opakováno, že rostliny nejsou schopny trehalózu využít, a že trehalóza je pro rostliny do jisté míry toxická. Oproti tomu u orchidejí bylo opakovaně pozorováno, že jsou schopny trehalózu využít. Obecná představa je taková, že tato schopnost orchidejí souvisí s jejich mykoheterotrofním stádiem vývoje (Smith, 1973). Tato diplomová práce se zabývá využitím trehalózy právě u těchto časných vývojových stádií orchidejí – protokormů. Tím, že byly protokormy kultivovány ve tmě, je v podstatě vyloučen příjem energie a uhlíku z jiného zdroje, než je použité médium. V tomto bodě je nutné zmínit určitý nedostatek použité metodiky. V použitém SMS médiu byl vždy obsažen ve velmi malém množství sacharid inositol, a tak je formulace používaná v průběhu práce, že kontrolní médium SMK neobsahuje sacharidy, poněkud nepřesná. Vzhledem k tomu, že ale na médiu SMK u všech druhů byl růst protokormů naprosto minimální, je tento nedostatek také pravděpodobně jen minimální. Navíc tento sacharid byl přítomen ve všech variantách média, a tak nehrozí zkreslení výsledků mezi variantami, pokud nepřipustíme, že kombinace inositolu s jednotlivými použitými sacharidy je nějakým způsobem unikátní a vyvolává specifickou odpověď. Práce, které se doposud zabývaly využitím trehalózy u orchidejí, sledovaly zpravidla jen velmi malé množství parametrů vypovídajících o reakci orchidejí na exogenní trehalózu. Je ovšem důležité zdůraznit, že obecně role sacharidů není jen energetická, ale také signalizační.

To právě pro trehalózu platí více než pro jiné sacharidy, a je proto velice důležité zabývat se podrobně změnami v metabolismu orchidejí kultivovaných na trehalóze. Hlavní závěry těchto experimentů se ovšem týkají právě metabolizace trehalózy, o vlivu na signalizaci je zde možné vyvozovat jen relativně málo. Původně byla do experimentů zahrnuta také analýza abundance transkriptů trehalázy či trehaláz. Z časových důvodů ovšem tato byla dovedena pouze do fáze RNA přepsané do cDNA. Tato analýza bude ale do budoucna jistě dokončena a vylepší pohled na utilizaci trehalózy u orchidejí. Zejména umožní ukázat, zda u protokormů pěstovaných na trehalóze docházelo k zvýšení míry genové exprese trehalázových genů. Tyto experimenty mají ještě některé další limitace, které je vhodné uvést ještě před diskuzí výsledků. Pro stanovení obsahu RWC představovala často problém nízká váha sušiny protokormů z kontrolního média SMK, která často byla pod detekčním limitem použitých analytických vah. Z tohoto důvodu jsou také vyjádřeny obsahy sacharidů v mg/g čerstvé váhy. Tento nedostatek se projevil především při stanovování obsahu škrobu v kontrolních variantách, kde přečišťováním vzorků od rozpustných sacharidů pravděpodobně došlo ke ztrátám části rostlinného materiálu, a tím k zvýšení nepřesnosti. Další limitací analýzy sacharidů je nízká rozlišovací schopnost použité detekční metody, která neumožňuje rozlišit mezi sacharózou a trehalózou, které mají podobný retenční čas. Sacharóza a trehalóza jsou proto uváděny vždy souhrnně a nelze rozlišit, zda například některé druhy trehalózu do určité míry neakumulovaly. Čtenář si jistě povšimne, že v této části diskuze příliš nekonfrontuji výsledky této práce s výsledky jiných prací týkajících se utilizace trehalózy u orchidejí (Ernst *et al.*, 1971; Smith, 1973; Purves & Hadley, 1976; Jheng *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Sopalun *et al.*, 2010). Je tomu tak především proto, že vliv na všechny sledované parametry má do velice významné míry složení použitého média, které v podstatě každý autor, či autorský kolektiv používá jiné. Je známo, že například koncentrace některých solí v médiu může velice významně ovlivnit vývoj orchidejí (Liu *et al.*, 2006). Dle mého názoru má z tohoto důvodu největší význam porovnání růstu protokormů či rostlinek na různých variantách média pouze v rámci dané práce. Rozhodující přitom nejspíše není to, zda například na sacharózovém médiu byly protokormy 8 μ méně dlouhé než na médiu trehalózovém (Purves & Hadley, 1976), ale spíš zda se liší sledované parametry významně mezi různými variantami média a zejména zda se liší hodnoty parametrů mezi variantami média s přidanými sacharidy od média bez přidaných sacharidů. Autoři, až na výjimky (Ponert, 2009), bohužel také nepoužívají negativní kontrolu média bez sacharidů, což opět interpretaci výsledků mírně znehodnocuje. Dalším nedostatkem zmíněných prací je, že autoři se zpravidla soustředí pouze jen na jeden, či dva parametry. Například S. Smithová (1973) vyhodnocuje pouze velikost protokormů a velikost rostlinek. Autoři S. Purves a G. Hadley (1976) vyhodnocují velikost protokormů a klíčivost semen. V případě prací s rostlinkami R. Ernst a kolektiv (1971) vyhodnocují velikost listů a kořenů, jejich váhu a schopnost přenosu z *in vitro* do *in vivo* podmínek. Velice obtížně srovnatelné s výsledky této diplomové práce jsou i výsledky na embryogenních kulturách, kde se zpravidla hodnotí zejména tvorba somatických embryí a jejich vývoj do dospělé rostliny (Jheng *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Sopalun *et al.*, 2010). Ve všech zmíněných pracech

je ovšem trehalóza do různé míry srovnatelná jako zdroj uhlíku a energie pro protokormy či rostlinky orchidejí, což je dle mého názoru nejdůležitější informace.

5.1.1. *Neuwiedia zollingeri*

U tohoto druhu bohužel nelze nic vyvozovat o jeho schopnosti využít trehalózu. Kultivace se totiž nezdařila. Vzhledem k tomu, že žádný druh z této podčeledi zatím nebyl kultivován, nejde o zcela překvapivý výsledek. Nejsou totiž logicky dostupné žádné informace o jeho kultivaci. Co ovšem lze z výsledků této práce vyvodit o kultivaci tohoto druhu je, že použité kultivační postupy pravděpodobně nejsou vhodné. Do budoucna zde nejspíše bude nutné najít stimul narušující dormanci semen tohoto druhu. Semena se zdají mít poměrně silné osemení a klíčení by patrně mohla napomoci jeho skarifikace. Mohlo by jít například o ošetření úspěšně použitá u jiných druhů orchidejí, jako je ošetření kyselinou sírovou, nebo dlouhodobé smáčení ve vodě (Rasmussen, 1995), či narušení osemení ultrazvukem (Miyoshi & Mii, 1988).

5.1.2. *Paphiopedilum barbatum*

V odborné literatuře není o pokusech kultivovat rostliny z podčeledi Cypripedioideae na trehalóze jakožto výhradním zdroji energie zatím žádný záznam. Druh *P. barbatum* spolu s dalším zahrnutým druhem *P. niveum* jsou tak prvními druhy orchidejí z této podčeledi, které byly doposud na trehalóze kultivovány. Z toho důvodu ale také nelze příliš diskutovat účinek trehalózy na rostliny z této podčeledi s jinými pracemi. V minulosti ale již byly sacharóza a glukóza popsány jako sacharidy s dobrým účinkem a klíčení rodu *Paphiopedilum* (Burgeff, 1936; Stimart & Ascher, 1981). Výsledky této práce jsou tak s těmito pozorováními ve shodě. Klíčivost druhu *P. barbatum* byla v tomto experimentu nejnižší na médiu bez přidaných sacharidů oproti médiím s přidanými sacharidy. To může ukazovat na možnou stimulaci klíčení semen tohoto druhu přítomností sacharidů. Nejvyšší klíčivost byla pozorována na trehalóze a sacharóze; z tohoto pohledu pak může právě trehalóza být vhodným zdrojem energie či stimulem pro klíčení semen. Tomu odpovídají i výsledky dalšího pozorovaného parametru, velikosti. Velikost protokormů byla také srovnatelná na médiích obsahujících sacharózu a trehalózu. Důležité je přitom především porovnání s médiem bez sacharidů, kde můžeme vyloučit využití jiných zdrojů energie než zásobních látek obsažených v semeni. Zásoby v semenech rodu *Paphiopedilum* jsou přitom pravděpodobně velice omezené, jak bylo pozorováno například u druhu *P. delenatii* (Lee *et al.*, 2006). Toto porovnání mezi médií se sacharidy a médiem bez sacharidů opět vypovídá o schopnosti rostlin tohoto druhu trehalózu využít. O pozitivním vlivu trehalózy na rostliny *P. barbatum* vypovídá i pozorovaná nulová úmrtnost na trehalózovém médiu. Nulová úmrtnost byla pozorována také na médiu bez přidaných sacharidů, a naopak na médiích s glukózou a sacharózou docházelo k odumírání protokormů. Z toho důvodu lze vyvozovat, že sacharóza a glukóza mohou mít do určité míry toxický účinek na časná vývojová stadia tohoto druhu. Další analýzy u tohoto

druhu nebyly provedeny. Celkově lze přesto u druhu *P. barbatum* konstatovat, že trehalóza představuje vhodný zdroj uhlíku a energie pro jeho růst. Vzhledem k absenci pozorování dalších parametrů u tohoto druhu nelze nic vyvozovat nic dalšího o vlivu trehalózy na jeho metabolismus. Nyní následuje další druh rodu *Paphiopedilum*, *P. niveum*. Tím je alespoň do určité míry nahrazena ušlá informační hodnota chybějících parametrů u *P. barbatum*.

5.1.3. *Paphiopedilum niveum*

Druh *P. niveum* je dalším zahrnutým zástupcem podčeledi Cypripedioideae. V tomto ohledu je velice zajímavé porovnání klíčivosti *P. barbatum* a *P. niveum*, tedy dvou blízce příbuzných druhů. Navzdory tomu, že tyto spadají do stejného rodu, klíčivost byla u *P. niveum* opačně oproti *P. barbatum* nejvyšší na médiu bez sacharidů. U *P. niveum* tak možná dochází naopak k mírné inhibici klíčení vlivem přidaných sacharidů. Vliv různých sacharidů u různých druhů rostlin na klíčivost se poměrně značně liší. Například u huseníčku *A. thaliana* byla popsána inhibice klíčení způsobená glukózou (Price *et al.*, 2003; Dekkers *et al.*, 2004). U čiroku *Sorghum bicolor* byla podobně popsána inhibice manitolem, která pravděpodobně souvisí s osmotickým stresem manitolem vyvolaným (Gill *et al.*, 2002). Glukóza může podobně jako manitol vyvolávat osmotický stres (Tholalakalabavi *et al.*, 1994), a tak její vliv na klíčení může být tímto vysvětlen. U huseníčku *A. thaliana* bylo však zjištěno, že inhibiční efekt glukózy na klíčení je nezávislý na osmotickém stresu a je patrně zprostředkovaný specifickou signální drahou, která souvisí se signalizací kyseliny abscisové (Price *et al.*, 2003; Dekkers *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2012). Lze tedy předpokládat, že i v případě orchidejí by mohla glukóza působit jako signál. U orchideje *Goodyera repens* byla popsána nejvyšší klíčivost právě na glukózovém médiu (Purves & Hadley, 1976), což nasvědčuje tomu, že osmotický stres nemusí pro klíčení orchidejí představovat překážku. Srovnání klíčivosti na médiu s trehalózou a na médiu bez přidaných sacharidů bylo zatím v odborné literatuře provedeno pouze právě u *G. repens*, kde klíčivost na médiu bez sacharidů byla dokonce nulová, zatímco na médiích s přidanými sacharidy se klíčivost pohybovala v rozmezí 70 -80 % (Purves & Hadley, 1976), a o stimulaci klíčení sacharidy tak zde nemůže být pochyb. U orchidejí bylo ve stejné studii popsáno, že klíčivost na médiu s trehalózou je více či méně srovnatelná s klíčovostí na médiích s jinými sacharidy, jako glukóza, fruktóza a sacharóza, naopak manitol zde klíčení zcela inhiboval (Purves & Hadley, 1976). U orchidejí rudohlávkou *Anacamptis morio* a prstnatce *D. majalis* bylo ukázáno, že vliv různých sacharidů na jejich klíčení se velice různí (Dostálová, 2016), a nelze tak jednoznačně říci, že by sacharidy působily inhibičně, či stimulačně na jejich klíčení. Jediný sacharid, který u obou druhů inhiboval klíčení, byla manóza (Dostálová, 2016). Inhibice klíčení manózou byla popsána i u *A. thaliana*, kde manóza disbalancuje hexokinázovou signalizaci, což patrně bude důvodem inhibice klíčení i u zmíněných orchidejí (Pego *et al.*, 1999). Vliv sacharidů ovšem může být značný i na přechod rostlin do postembryonální fáze vývoje (Tanaka *et al.*, 2008), o čemž u orchidejí ovšem není nic známo. Co se týče úmrtnosti, jsou oba druhy rodu *Paphiopedilum* srovnatelné v tom smyslu, že nejvyšší úmrtnost byla pozorována na médiu s glukózou, ačkoliv u *P. niveum* nebyl rozdíl oproti jiným sacharidům

statisticky průkazný. Za tento efekt může být zodpovědný osmotický stres potenciálně vyvolaný glukózou (Tholalakalabavi *et al.*, 1994). U druhu *P. niveum* byly protokormy největší na médiu s trehalózou, naopak na médiu bez přidaných sacharidů byly tyto velice malé. Velikost protokormů byla tak sice rozdílná na médiích s různými sacharidy, ale všechny použité sacharidy jsou protokormy *P. niveum* patrně schopny využívat. Relativní obsah vody byl u *P. niveum* zaznamenán nejvyšší u protokormů na médiu bez přidaných sacharidů, tyto tak patrně pouze akumulují vodu z média. Na médiu obsahujícím trehalózu byl oproti ostatním médiím se sacharózou a glukózou zvýšený RWC, protokormy tak na trehalóze také akumulují více vody. To může souviset například s hydratačními vlastnostmi trehalózy (da Costa Morato Nery *et al.*, 2008). Vyšší RWC na médiu s trehalózou může být do určité míry také zodpovědný za největší velikost těchto protokormů.

Velice výrazný vliv měly u tohoto druhu sacharidy přidané do média na endogenní obsah sacharidů v protokormech. Na médiu s glukózou bylo v protokormech obsaženo nejvíce rozpustných sacharidů, zejména pak glukózy, kterou tyto protokormy patrně akumulovaly. Celkově však vysoký obsah rozpustných sacharidů v této variantě může souviset s nižším RWC. Je totiž možné, že glukóza působila protokormům osmotický stres, a tak došlo i k akumulaci spojeného obsahu sacharózy a trehalózy. Relativní zastoupení rozpustných sacharidů bylo poměrně podobné tomu pozorovanému u protokormů *Dactylorhiza maculata* ssp. *maculata* (Ponert, 2009). Nejvíce škrobu bylo obsaženo v protokormech kultivovaných na médiu se sacharózou, tato tak patrně ovlivňuje energetickou bilanci v protokormech směrem k ukládání rezerv, možná částečně proto byly tyto protokormy o něco menší než na médiu s trehalózou. Naopak nejméně rozpustných sacharidů i škrobu bylo z protokormů pěstovaných na médiích s přidanými sacharidy na médiu s přidanou trehalózou. Trehalóza je tak zde patrně využívána směrem k syntéze jiných látek než sacharidů. Mohlo by jít například o proteiny, či organické kyseliny. Zvýšená syntéza proteinů a organických kyselin byla totiž pozorována při zvýšení obsahu T6P u huseníčku *A. thaliana* (Figueroa *et al.*, 2016). I v případě protokormů *P. niveum* by tak mohlo přes signál T6P stimulovaný exogenní trehalózou docházet k podobnému ovlivnění metabolismu uhlíku. Očekávatelně nejméně sacharidů bylo v protokormech pěstovaných na médiu bez sacharidů, kde bylo naměřeno jen malé množství fruktózy a sacharózy dohromady s trehalózou. Je tedy možné, že semena tohoto druhu neobsahují velké množství zásobních látek, podobně jako semena jiných orchidejí, nebo že tyto zásoby spotřebovala během klíčení.

Co se týče obsahu sacharidů v médiu, ve všech variantách média bylo po kultivaci rostlin naměřeno určité množství jiných sacharidů, než jaké byly do média přidány před kultivací. Protokormy tak jednak nejspíše určité množství sacharidů do média vylučují, jelikož malé množství sacharidů bylo naměřeno i v médiu bez přidaných sacharidů. Vylučování řady látek včetně sacharidů, společně nazývaných jako kořenové exudáty, je běžné u kořenů rostlin (Azcon & Ocampo, 1984; Lugtenberg *et al.*, 1999). U protokormů orchidejí by bylo možno uvažovat, že jde o nějaký způsob komunikace s mykorhizní houbou, či asociovanými bakteriemi. U lilku *Solanum lycopersicon* ale sacharidy vylučované kořeny pravděpodobně atrahují pouze některé bakterie (Lugtenberg *et al.*, 1999), nikoliv však mykorhizní houby (Azcon & Ocampo, 1984). Jako atraktans pro mykorhizní houby pravděpodobně fungují zejména flavonoidy a strigolaktony

(Steinkellner *et al.*, 2007). Druhým důvodem pro přítomnost jiných, než přidaných sacharidů v médiu po kultivaci je, že protokormy štěpí sacharid v médiu extrakorporálně či v apoplastu. Je známo, že kořeny rostlin vylučují celou řadu enzymů, včetně invertáz (Dormer & Street, 1949), či amyláz (Chang & Bandurski, 1964). V sacharózovém médiu bylo naměřeno poměrně velké množství glukózy a fruktózy, což ukazuje na štěpení sacharózy invertázou či sacharózasyntázou. Podobně v trehalózovém médiu bylo po kultivaci zaznamenáno poměrně velké množství glukózy, což ukazuje na extracelulární aktivitu trehalázy. Toto pozorování je v souladu s pozorováním Ernsta (1971), který naměřil určité množství glukózy v trehalózovém médiu po kultivaci hybridního mřovce (*Phalaenopsis*). Je tak možné, že orchideje jsou přizpůsobeny mykoheterotrofnímu způsobu výživy právě vylučováním trehaláz na fyzické rozhraní s houbou. Význam vylučování enzymů štěpících sacharózu pravděpodobně nemá s mykoheterotrofií orchidejí žádný vztah, vzhledem k tomu, že houby sacharózu nesyntetizují. Extracelulární invertázy jsou však u rostlin běžné (Roitsch & González, 2004; Orchidaceae *et al.*, 2014).

Celkově lze u protokormů *P. niveum* konstatovat, že trehalózu jsou schopny využít srovnatelně s glukózou a sacharózou. Trehalóza přitom ovlivňuje zejména celkový obsah sacharidů. Je také velmi pravděpodobné, že protokormy tohoto druhu vylučují trehalázu, a tak štěpí trehalózu alespoň částečně ještě před jejím vstupem do buněk, a do buněk tak patrně vstupuje částečně i vzniklá glukóza. Pokud je mi známo, jde o první pokus o kultivaci rostlin z této podčeledi orchidejí (Cypripediodeae) a lze říci, že jsou k využití trehalózy schopny podobně jako orchideje z jiných podčeledí, viz dále.

5.1.4. *Thelymitra nuda*

Druh *T. nuda* podle výsledků všech zahrnutých parametrů je podobně jako výše uvedené druhy schopen využít trehalózu. Na rozdíl od předchozích druhů však tento druh spadá do podčeledi Orchidoideae, a lze tak lépe srovnávat s literárními údaji, jelikož několik druhů z této podčeledi již bylo kultivováno na trehalóze. Z této podčeledi byly kultivovány druhy *Dactylorhiza purpurella* (Smith, 1973), *Goodyera repens* (Purves & Hadley, 1976), *Dactylorhiza maculata* (Ponert, 2009) a *D. majalis* (Ponert *et al.*, in prep.). U všech zmíněných druhů bylo prokázáno, že jsou schopny trehalózu využít, a to přibližně srovnatelně se sacharózou. *T. nuda* přitom reprezentuje jinou vývojovou linii než uvedené druhy, konkrétně tribus Diuridae, subtribus Thelymitrinae. Jde tak o první doklad toho, že i další vývojové linie této podčeledi jsou schopny trehalózu využít. Stejný tribus v této diplomové práci reprezentuje ještě druh *Diuris magnifica*, který je též schopen využít trehalózu, podobně jako druh *Ludisia discolor* z tribu Cranichidae, jak bude diskutováno dále.

Klíčivost *T. nuda* má podobný motiv, jako například u druhu *P. barbatum*, či *D. magnifica*. Nejvyšší klíčivost je zde na médiích se sacharidy a průkazně nižší na médiu bez přidaných sacharidů. Zajímavé je, že u druhu z této podčeledi, *G. repens*, byla na médiu bez sacharidů pozorována dokonce nulová klíčivost (Purves & Hadley, 1976), což dohromady ukazuje na možnou úlohu sacharidů ve stimulaci klíčení semen z této podčeledi. Výrazný rozdíl oproti zmíněné práci může být dán tím, že autoři použili zcela jiné médium.

Co se týče velikosti protokormů, byly protokormy v tomto případě podobně jako například u druhu *P. niveum* pozorovány na médiu s trehalózou, naopak velice malé protokormy byly na médiu bez sacharidů oproti všem médiím s přidanými sacharidy. Opět se zde tedy opakuje motiv pozorovaný u *P. niveum*, přičemž stejný motiv se bude opakovat do určité míry i u všech dalších uvedených druhů.

Sacharidy obsažené v médiu v případě tohoto druhu neměly příliš velký vliv na obsah endogenních sacharidů, což potenciálně ukazuje na to, že všechny sacharidy jsou stejně vhodné jako zdroj uhlíku, jelikož neovlivňují bilanci sacharidového metabolismu. Zvýšený obsah glukózy a sacharózy dohromady s trehalózou v protokormech kultivovaných na médiu obsahujícím sacharózu je poměrně obtížně interpretovatelný. Je například možné, že protokormy sacharózu akumulovaly. Obsah sacharidů v médiích po kultivaci protokormů má podobný motiv, jaký byl pozorovaný v médiích po kultivaci protokormů druhu *P. niveum*. A to ten, že opět ve všech variantách média byl obsažen po kultivaci i jiný než původně přidaný sacharid. Tento motiv se bude opakovat u všech následujících druhů.

5.1.5. *Diuris magnifica*

U druhu *D. magnifica* lze opět na základě výsledků sledovaných parametrů poměrně jistě říci, že tento druh je schopen trehalózu využít. Klíčivost opět byla nejvyšší na médiích s přidanými sacharidy, a i zde tak patrně sacharidy stimulují klíčení. Na všech variantách médií ovšem byla pozorována poměrně vysoká úmrtnost, což v tomto případě mohlo být dáno například konkrétními použitými semeny.

Velikost protokormů opět vykazuje výše několikrát zmíněný motiv – největší protokormy byly naměřeny na médiích se sacharidy. Protokormy byly v tomto případě zcela největší na médiu s glukózou, všechny sacharidy ale byly patrně protokormy přijímány dobře. Nejspíše kvůli malému počtu pozorování nebyl prokázán rozdíl mezi variantami v RWC, je ovšem poměrně dobře patrné, že nejnižší RWC měly protokormy kultivované na médiu s glukózou, podobně jako například u druhu *P. maculata*, který bude diskutován dále. To může souviset například s tím, že glukóza je redukující sacharid a ve velkém množství může vést u rostlin k osmotickému stresu a mimo jiné také k akumulaci některých cukrů (Tholalakabavi *et al.*, 1994). Obsah cukrů byl v případě *D. magnifica* skutečně nejvyšší právě v protokormech na médiu obsahujícím glukózu, skutečně se tedy zdá, že glukóza zde osmotický stres protokormům způsobuje. Zcela paralelní je v tomto ohledu i situace u zmíněné *P. maculata*, osmotický stres tak může být obecnějším projevem kultivace orchidejí na glukózovém médiu. Zajímavý je zde též poměrně vysoký obsah škrobu v protokormech pěstovaných na médiu s trehalózou. U ostatních druhů se podobný motiv nikde nevyskytoval. Snadno by ale mohl být interpretován tak, že exogenní trehalóza zde podobně jako u huseníčku *A. thaliana* (Wingler *et al.*, 2000; Kolbe *et al.*, 2005) stimuluje syntézu škrobu. Například u druhu *P. niveum* bylo ale naopak škrobu v protokormech kultivovaných na trehalózovém médiu vzhledem k ostatním variantám nejméně. Je tedy pravděpodobné, že regulace obsahu škrobu trehalózou je u různých druhů orchidejí regulována různě. U většiny zde zahrnutých druhů trehalóza obsah škrobu nijak neovlivnila v porovnání s glukózou a sacharózou. Nejvíce škrobu ale bylo u *D. magnifica* naměřeno v protokormech

kultivovaných na médiu bez sacharidů. Zdá se, že semena tohoto druhu tak obsahují poměrně velké množství škrobu, případně po imbibici dochází k přeměně jiných zásobních látek na škrob. U některých druhů orchidejí obsahují semena relativně velké množství škrobu (Harvais, 1974; Tian *et al.*, 1985; Guo & Xu, 1990), a tak toto pozorování není zcela ojedinělé. Co se týče obsahu sacharidů v médiích po kultivaci protokormů, je situace velmi podobná té popsané u výše uvedených druhů.

5.1.6. *Ludisia discolor*

U tohoto druhu lze podle pozorovaných parametrů říci poměrně s jistotou, že je trehalózu schopen využívat jakožto zdroj uhlíku a energie. U tohoto druhu byla zařazena také varianta média s trehalózou přidanou zároveň s inhibitorem trehalázy validamycinem A, což do značné míry zlepšuje interpretaci výsledků tohoto experimentu. Do budoucna bude záhodno doplnit i experimenty u dalších druhů orchidejí o tuto variantu. Zajímavý je výsledek na médiu s trehalózou spolu s validamycinem hned u prvního pozorovaného parametru, klíčivosti. Semena klíčila nejlépe na trehalózovém a sacharózovém médiu, naopak nejméně na médiu bez sacharidů a na médiu s trehalózou a validamycinem. To poměrně jasně ukazuje na to, že pozitivní efekt trehalózy na klíčení semen je zde zprostředkován činností trehalázy, a pravděpodobně tak využití trehalózy probíhá přes glukózu vzniklou jejím štěpením. V tomto ohledu je pak ale zajímavé, že glukózové médium bylo relativně méně vhodné pro klíčení než trehalózové. Je tedy například možné, že trehalóza je semeny pohotověji přijímána než samotná glukóza, či že glukóza ve velké koncentraci má negativní efekt na klíčení semen. V podstatě totožný motiv s klíčivostí má u tohoto druhu také velikost protokormů, kdy na médiu bez sacharidů a na médiu s přidanou trehalózou dohromady s validamycinem byly protokormy výrazně menší, což opět jednoznačně ukazuje na úlohu trehalázy v utilizaci trehalózy. Je ovšem také možné, že činnost trehalázy je obecně nutná pro klíčení či vývoj protokormů. Pro testování této hypotézy by bylo nutné vytvořit i varianty médií s glukózou a sacharózou s přidaným validamycinem A. Relativní obsah vody protokormů byl na těchto variantách média naopak nejvyšší – pravděpodobně tak u těchto docházelo k akumulaci vody, podobně jako u druhů *P. niveum* a *P. maculata* (který bude diskutován níže). Protokormy kultivované na médiu s trehalózou a validamycinem ovšem obsahovaly podobné množství sacharidů, jako protokormy na médiích s přidanými sacharidy, na rozdíl od protokormů kultivovaných na médiu bez sacharidů. Protokormy kultivované na médiu s trehalózou a validamycinem tak patrně trehalózu přidanou do média akumulovaly, zároveň také obsahovaly nevýznamně vyšší množství škrobu, a je tak možné, že akumulovaná trehalóza mírně ovlivňovala jejich energetický metabolismus, jako bylo pozorováno například u *A. thaliana* (Wingler *et al.*, 2000; Kolbe *et al.*, 2005), či v této práci u *D. magnifica*. Naopak obsah i zastoupení endogenních sacharidů v protokormech na médiu s trehalózou a na médiu se sacharózou jsou velice podobné, a tak je pravděpodobné, že za přirozených podmínek trehalóza změny v metabolismu u tohoto druhu nepůsobí. Zajímavé je, že ani v protokormech kultivovaných na médiu s trehalózou a validamycinem a médiu bez přidaných sacharidů nebyla přítomna glukóza v neměřitelném množství. Patrně tak trehalázová aktivita vede nějakým způsobem k produkci

glukózy.

Ve všech variantách média opět byl přítomen i jiný sacharid, než jaký do médií byl původně přidán. Pouze v médiu bez sacharidů a v médiu s trehalózou a validamycinem nebyla přítomna glukóza, což ukazuje na úlohu trehalázy v degradaci exogenní trehalózy.

5.1.7. *Pleione maculata*

Druh *Pleione maculata* je jediným druhem z podčeledi Epidendroideae zahrnutým v této práci a lze u něho jako u všech dříve diskutovaných druhů opět konstatovat, že trehalózu je schopen utilizovat. U jiných druhů (zástupců rodů *Bletilla*, *Phalaenopsis*, *Gramatophyllum* a *Oncidium*) z této podčeledi bylo už v minulosti ukázáno, že jsou schopny využívat trehalózu jakožto zdroj energie a uhlíku (Ernst *et al.*, 1971; Smith, 1973; Jheng *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Sopalun *et al.*, 2010). Pouze druhy rodů *Bletilla* a *Phalaenopsis* (Ernst *et al.*, 1971; Smith & Smith, 1973) ale byly pěstovány ze semen, u ostatních druhů šlo o embryogenní kultury. Zajímavé je, že na rozdíl od ostatních druhů zahrnutých v této práci byla u tohoto druhu klíčivost zcela neovlivněna variantou média. Protokormy tohoto druhu byly opět největší na médiích obsahujících sacharidy, v tomto případě největší na glukózovém médiu, ačkoliv na tomto médiu byla velikost protokormů velice variabilní mezi Petriho miskami. Je možné si představit scénář, ve kterém glukóza například oddálí klíčení semen, podobně jako bylo ukázáno u *A. thaliana* (Dekkers *et al.*, 2004), přičemž délka oddálení se může na jednotlivých miskách lišit, a vést tak k pozorovanému efektu. Podobně jako u *D. magnifica*, i zde byl prokázán nejvyšší RWC na médiu bez sacharidů, statisticky průkazně nejnižší zde ale byl RWC na médiu s přidanou glukózou, což opět ukazuje na možný osmotický stres způsobený exogenní glukózou. Co se týče obsahu endogenních sacharidů, lišil se tento poměrně výrazně pro všechny sacharidy v protokormech kultivovaných na médiu bez sacharidů a na médiích obsahujících sacharidy. Relativně velmi vysoké množství škrobu bylo naměřeno v protokormech kultivovaných na médiu bez přidaných sacharidů, a tak se zdá, že podobně jako u *D. magnifica*, i zde obsahují semena relativně velké množství zásob ve formě škrobu nebo zásob, které mohou dát vznik škrobu. Obsah všech endogenních sacharidů se mezi variantami velmi lišil, a tak se zdá, že všechny přidané sacharidy poměrně specificky působí na metabolismus protokormů tohoto druhu. Glukóza se na glukózovém médiu v protokormech patrně akumulovala, a je možné, že podobně tomu bylo u protokormů s trehalózou na trehalózovém médiu, ovšem bez rozlišení trehalózy a sacharózy to nelze říci. Obsah sacharidů v médiu byl opět velice podobný tomu uvedenému u ostatních druhů. Podobně jako u všech druhů kromě druhu *P. niveum*, nebyla v médiu bez sacharidů po kultivaci přítomna glukóza, protokormy bez dodaného sacharidu tak glukózu na rozdíl od fruktózy a sacharózy nevylučují.

5.1.8. Čeleď Hypoxidaceae

Je obecně známo, že rostliny z této čeledi mají obtížně porušitelnou dormanci semen, což se v tomto experimentu potvrdilo. Původní záměr experimentu testovat využití sacharidů a vliv sacharidů na vývoj těchto rostlin, tak jako výše u orchidejí, se tak postupně změnil ve snahu nalézt vhodné kultivační postupy pro tyto rostliny. Z toho důvodu zde budu diskutovat především kultivační postupy těchto rostlin a možné důvody jejich nezdaru s ohledem na dostupnou literaturu. Výsledkem těchto experimentů je u druhů *Hypoxis decumbens* a *Pauridia capensis* stručná dokumentace časných vývojových stádií těchto druhů, která, pokud je mi známo, doposud nebyla popsána.

K *in vitro* kultivaci druhů z této čeledi ze semene existuje jen málo studií a téměř všechny studie se věnují medicínsky velmi důležitému druhu *Hypoxis hemerocallidea*, který byl také do experimentu zahrnut. K ostatním zahrnutým druhům, *Pauridia capensis* a *Hypoxis decumbens*, alespoň pokud je mi známo, literatura na toto téma neexistuje. Použitá ošetření k narušení dormance semen byla zvolena podle informací dostupných o kultivaci *H. hemerocallidea*. Velice nízká klíčivost dosažená v experimentech by mohla být vysvětlena tím, že semena potřebují ke klíčení světlo podobně, jak je časté u jiných rostlin. V odborné literatuře bylo několikrát popsáno, že světlo sice klíčivost těchto semen mírně zvyšuje, není však nutným stimulem pro jejich klíčení (Hammerton & van Staden, 1988; Shaik *et al.*, 2014).

K narušení fyziologické dormance semen byla použita inkubace v roztoku GA3 (kyselina gibberelová), v koncentraci 1200 ppm po 24 hodin (Shaik *et al.*, 2014) se sacharózou. Dále bylo použito několik způsobů chemické a mechanické skarifikace k narušení fyzikální dormance. Chemická skarifikace kyselinou sírovou, ani hydroxidem sodným není k narušení dormance vhodná (Hammerton & van Staden, 1988), a tak bylo použito ošetření chlornanem vápenatým a chlornanem sodným. Mechanická skarifikace byla provedena smrkovým papírem (Shaik *et al.*, 2014), pinzetou a svěrákem. Mechanická skarifikace je zde pravděpodobně nutná k narušení fyzické dormance semen (Hammerton & van Staden, 1988; Shaik *et al.*, 2014). Do budoucna by mohlo být vhodné vyzkoušet například skarifikaci ultrazvukem, či dlouhodobým smáčením ve vodě. Je ale také možné, že použitá semena nebyla životaschopná. U druhu *H. hemerocallidea* bylo popsáno, že semena tohoto druhu mohou klíčit po době kultivace delší než jeden rok (Hammerton & van Staden, 1988), což je doba delší, než po kterou probíhaly pokusy v této práci. Zároveň také bylo popsáno, že klíčivost semen *H. hemerocallidea* je do značné míry závislá na místě a podmínkách, ve kterých se matečná rostlina v době produkce semen nachází, a životaschopnost semen je velice variabilní (Hammerton *et al.*, 1989). U druhu *H. hemerocallidea* byla použita semena od stejné firmy, jako byla použita jinými autory (Shaik *et al.*, 2014), i přesto je ovšem možné, že byla semena neživotaschopná.

Další možností, proč semena neklíčila, by mohla být inhibice klíčení některou ze složek použitých médií, například sacharidy, nebo vysokou koncentrací dusíkatých látek. Inhibice dusíkatými látkami ve velice nízkých množstvích byla popsána například u některých orchidejí (Ponert *et al.*, 2013). Autoři výše citovaných článků klíčili semena na vlhkém filtračním papíru a nízká klíčivost v mnou provedených

experimentech mohla být dána právě použitým médiem. Proto byla použita kromě SMS média i média obsahující méně dusíkatých látek – BM1, MoX a čistý agar (médiu X0), která se u našeho týmu osvědčila při výsevu některých druhů orchidejí citlivých k vyššímu obsahu dusíkatých látek v médiu. (Konkrétnější parametry kultivace viz kapitola 3.6 a Příloha 2). Klíčivost ale byla na všech variantách velice nízká, či nulová, včetně média X0, a možnost inhibice složkami média je tak nepravděpodobná. V současnosti se u druhu *H. hemerocallidea* pro komerční množení používají například somatická embrya, která mají vysokou klíčivost (až 90 %; Kumar *et al.*, 2017), ovšem pro tento experiment by byla pravděpodobně nevhodná. Zajímavý výsledek přineslo klíčení druhu *Pauridia capensis*. Útvar, který vznikl po vyklíčení semen tohoto druhu, byl poměrně odlišný od standardní klíčící rostliny, která vznikla klíčením kultivovaného druhého druhu, *Hypoxis decumbens*. Zdá se, že *P. capensis* po svém vyklíčení produkuje útvar do jisté míry podobný protokormům orchidejí, ačkoliv na rozdíl od protokormů je prvním vyvíjejícím se útvarem v tomto případě primární kořen, a tak o protokorm jako takový nejde. Je možné spekulovat, že tento odlišný způsob vývoje *P. capensis* od *H. decumbens* je dán jejich pozicí v rámci čeledi Hypoxidaceae. Tato čeleď vytváří tři oddělené větve a zmíněné druhy patří každý do jiné (Kocyan *et al.*, 2011). Z toho důvodu by bylo zajímavé zahrnout do dalších experimentů další druhy z těchto větví a zahrnout i druhy ze třetí větve, např. zástupce rodů *Curculigo*, či *Molineria*. Je možné, že i v rámci této čeledi se vyvinula nějaká forma mykoheterotrofie, zatím však byla popsána u rostlin této čeledi pouze arbuskulárně mykorhizní symbióza (Prajapati *et al.*, 2003).

5.2. Histolokalizace trehalázové aktivity

Je velice pravděpodobné, že schopnost orchidejí využít trehalózu souvisí s jejich obligátně mykoheterotrofním stádiem vývoje. Většina druhů orchidejí ale zůstává po celý svůj život v symbióze s mykorhizní houbou (Rasmussen, 1995). V této práci jsem se proto zaměřila také na histolokalizaci trehalázové aktivity v mykorhizních kořenech dospělých rostlin orchidejí. Experimenty byly provedeny na třech druzích orchidejí: *Paphiopedilum purpuratum*, *Ludisia discolor* a *Ludisia discolor*. U všech zařazených druhů bylo poměrně jednoznačně ukázáno, že trehalázová aktivita kolokalizuje s oblastmi infikovanými mykorhizní houbou. Asi nejvýraznější byla tato korelace u *L. discolor*. U tohoto druhu bylo zároveň zajímavé, že houbové smotky trehalázovou aktivitu často nevykazovaly a patrně tedy byla trehalázová aktivita zejména rostlinného charakteru. U ostatních druhů byly samotné smotky téměř vždy obarveny. Bohužel v rámci těchto experimentů není možné jednoznačně rozlišit, zda aktivita vizualizovaná barevným produktem byla v infikovaných oblastech dána houbovými, či rostlinnými trehalázami. Vhodnou doprovodnou metodou by zde bylo například srovnání míry genové exprese trehalázových genů obou symbiontů jak v mykorhizách a v extraradikálním myceliu a neinfikovaných oblastech kořene. Další možností by bylo upravení histolokalizační metody tak, aby bylo dostatečně specifická na subcelulární úrovni. Pokud je mi známo, byla histolokalizace trehalázové aktivity

provedena v současnosti jen dvakrát. A to u prstnatce *D. majalis*, u kterého byla metoda použita v této diplomové práci vyvinuta (Ponert et al. 2017, in prep.). U tohoto druhu také trehalázová aktivita velice dobře kolokalizovala s mykorhizovanými oblastmi kořene. Druhou prací, kde byla provedena histolokalizace trehalázové aktivity byla použita u druhu dvoukřídleho hmyzu, masařky *Sarcophaga bullata* (Chang & Morrison, 1975). Zde byla metoda poněkud odlišná od té použité v této diplomové práci. Umožnila autorům lokalizovat trehalázovou aktivitu v létacích svalech *S. bullata* na subcelulární úrovni; zjistili například, že trehalázová aktivita je zde vázána zejména na vnitřní membránu mitochondrií. Podobné zdokonalení metody použité v této diplomové práci by bylo velice přínosné pro řešení otázky kolokalizace trehalázové aktivity s mykorhizovanými oblastmi kořenů orchidejí. Jelikož může být trehalázová aktivita rostlin patrně do značné míry ovlivněna posttranslačními regulacemi (O'Neill et al., 2012), jsou histochemické metody v tomto případě nejspíše vhodnější než molekulární metody. Přesto je ale možné, že i transkripční úroveň regulace trehalázové aktivity je v symbiózách rostlin nezanedbatelná (Brodmann et al., 2002).

Z výsledků získaných v histolokalizačních experimentech je zřejmé, že trehalázová aktivita je v mykorhizách orchidejí velice silná a dobře kolokalizuje s místy styku symbiontů. Zvýšení trehalázové aktivity indikované zvýšením míry genové exprese trehalázy je s velkou pravděpodobností průvodním jevem více symbióz rostlin. Ve většině případů je patrně trehalóza produkovaná symbiontem rostlinou reflektována jako patogenní agens a zvýšená trehalázová aktivita je zde pak spíše obranou reakcí rostliny (Aeschbacher et al., 1999; Brodmann et al., 2002). V OrM je však patrně houbová trehalóza využívána jako částečný, či výhradní zdroj energie a uhlíku, a zvýšení trehalázové aktivity je tak zde nejspíše trofickou odpovědí rostliny. V následující kapitole bude popsána evoluce trehalázových genů u podříše Embryophyta, a tedy i u orchidejí. Právě specifická úloha trehalázy u orchidejí se možná do značné míry podepsala na fylogenezi trehalázových genů u některých orchidejí.

5.3. Možné souvislosti s orchideoidně mykorhizní symbiózou

U rostliny, která získává uhlíkaté látky a energii zejména z fotosyntetizujících pletiv prýtu se tvoří sink v podzemních orgánech přeměnou sacharózy, popřípadě jiných rozpustných sacharidů na polysacharidy, proteiny či lipidy. Tímto je z velké části udržován gradient při vykládání rozpustných sacharidů z floému do sinkových pletiv. Na druhé straně u orchidejí během mykoheterotrofní či mixotrofní fáze fotosyntetizující pletiva buď nejsou vyvinutá, nebo produkují jen část uhlíkatých látek (případ mixotrofie) a zdroj uhlíkatých látek a energie představuje symbiotická houba. Z toho důvodu je sink v kořenech orchidejí velice specifický. Protokormy orchidejí je z tohoto pohledu nutno uvažovat jako čistě sinková pletiva, vzhledem k minimálnímu množství zásob v nich obsažených. Gradient nemusí být tvořen přeměnou sacharózy, nebo jiného rozpustného sacharidu, transportovaného floémem ze zdrojových pletiv rostliny na zmíněné zásobní látky. Mohl by být tvořen jednoduše přeměnou houbové trehalózy na glukózu. Proto by sacharidová signalizace v mykorhizách orchidejí mohla fungovat odlišně než v standardním sinkovém pletivu. Příliš velké

koncentrace exogenní trehalózy totiž disbalancují systém sacharidové signalizace a vedou v kořeni k akumulaci škrobu a dalším změnám, vedoucích společně k zpomalení růstu kořenů (Wingler *et al.*, 2000). Například u huseníčku *A. thaliana* lze tohoto stavu docílit dodáním trehalózy do média (Wingler *et al.*, 2000; Schluepmann *et al.*, 2004; Van Houtte *et al.*, 2013).

Původně se předpokládalo, že snížení růstu kořenů je způsobeno tím, že sacharidy putující z floému jsou působením trehalózy zabudovávány do škrobu v takové míře, že dojde k zpomalení růstu (Wingler *et al.*, 2000). Další práce ale ukázaly, že pravděpodobněji je za tento efekt zodpovědná inhibice degradace škrobu v kořenech, kterou též způsobuje trehalóza (Ramon *et al.*, 2007). Nejspíše je za snížení růstu kořenů zodpovědný zásah trehalózy do signalizačního systému SnRK1 kinázy, potažmo transkripčního faktoru bZIP11. Tento zásah může vést k přeprogramování charakteru pletiva ze sinkového na zdrojové a takováto změna poté vede ke snížení míry růstu kořenů (Delatte *et al.*, 2011). Změny v růstu kořenů ale mohou být dány i vlivem trehalózové signalizace na tvar buněk (Chary *et al.*, 2007). Vystavení kořenů rostlin exogenní trehalóze v živném médiu lze chápat jako analogii k příjmu houbové trehalózy orchidejí. Ve chvíli, kdy sink pro sacharidy ze zdrojových pletiv rostlin je nahrazen sinkem pro houbové metabolity, je ovšem hypotetická situace velice odlišná. Nabízejí se dva základní scénáře.

Jednak ten, kde připustíme průnik trehalózy do vnitra buněk orchidejí. Aby v takovéto chvíli byl sink pro trehalózu udržován, je zapotřebí zejména degradovat trehalózu trehalázou na glukózu. Ovšem ani nižší aktivita trehalázy a z toho plynoucí vyšší intracelulární koncentrace trehalózy zde nemusí interferovat se sacharidovou signalizací, tak jak bylo popsáno v předchozím odstavci. Udržování sinku totiž není závislé na správném vybalancování sacharidové signalizace. Intracelulární obsah trehalózy tak může volně fungovat jako ukazatel síly sinku. Obsah trehalózy by pak mohl regulovat zejména aktivitu trehalázy a tím balancovat energetický metabolismus v pletivu. Ostatně u *A. thaliana* byla popsána přímá vazba transkripčního faktoru ATAF1 na promotor genu pro trehalázu. Tento transkripční faktor u *A. thaliana* způsobuje ustavení metabolomu charakteristického pro negativní energetickou bilanci. A proto, že stimuluje expresi trehalázy je zřejmé, že i trehaláza je pro ustavení takového metabolomu zásadní (Park *et al.*, 2013). Co se týče obsahu škrobu, bylo u symbiotických protokormů orchidejí pozorováno nižší množství škrobu, než v protokormech asymbiotických (Hadley, 1984) a podobně u mykorrhizních a nemykorrhizních kořenů (Hadley & Purves, 1974). Taková odpověď je ovšem opačná, než jaká byla pozorována u kořenů *A. thaliana* po vystavení exogenní trehalóze. To ukazuje buďto na možnost, že trehalózový signál je zde modifikován, případně, že blíže skutečnosti je alternativní scénář.

Dalším scénářem je ten, kde je trehalóza houbového původu v kolonizovaných protokormech či kořenech degradována ihned v apoplastu či extrakorporálně. Pokud je skutečně aktivita trehalázy, či trehaláz dostatečná pro rozštěpení vsí trehalózy, pak trehalóza neproniká ve velké míře do buněk a sacharidový signalizační systém může fungovat standardně. Za tohoto předpokladu je také možné, že v oblasti fyzického kontaktu symbiontů nejsou na membráně buněk orchideje přítomné přenašeče pro trehalózu ve velké hustotě. O těchto přenašečích u rostlin se však zatím pouze spekuluje a nebyly doposud izolovány ani

charakterizovány (Carillo *et al.*, 2013; Lunn *et al.*, 2014). Otázkou je, čím je uhlíkový sink v protokormech posilován. Je například možné, že glukóza vznikající štěpením trehalózy je v rostoucích protokormech velice rychle spotřebována (Smith, 1973). Druhou možností je například syntéza sacharózy z glukózy vzniklé štěpením trehalózy. Sacharóza se totiž u hub nevyskytuje, a tak by pro tvorbu sinku v rostlinných pletivech byla vhodná.

Ze situace popsané u *A. thaliana* by se mohlo zdát, že energetický metabolismus rostliny je extrémně citlivý na jakoukoli silnější změnu v koncentraci trehalózy, či T6P. Ovšem u jiných druhů rostlin, jako je maniok *Manihot esculenta*, kapari *Caparris ovata*, nebo rýže *Oryza sativa* bylo pozorováno značné fluktuování hladiny trehalózy bez znatelného vlivu na fenotyp rostliny (El-Bashiti *et al.*, 2005; Ilhan *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016). Dokonce i u *A. thaliana* může obsah trehalózy do určité míry kolísat (Kaplan *et al.*, 2004). Mechanismus, jakým trehalóza působí na intracelulární pochody je tedy pravděpodobně možné ve speciálních podmínkách či v různých pletivech do značné míry modifikovat. Lze si proto představit i možnost, kdy v mykorhizách orchidejí funguje trehalózový signál jedním způsobem a zcela odlišným způsobem funguje například v listech, květech či protokormech.

Výsledky této práce jsou do určité míry nakloněny oběma scénářům. U některých druhů došlo u protokormů kultivovaných na trehalóze ke změnám v obsahu a zastoupení sacharidů oproti protokormům pěstovaným na médiích s přidanou glukózou a sacharózou. U některých druhů žádné výrazné změny zaznamenány nebyly, podobně jako bylo pozorováno u semenáčků prstnatce *D. maculata* (Ponert, 2009). Lze tak říci, že trehalóza patrně u některých druhů se sacharidovým metabolismem interferuje, ovšem u žádného druhu nebyla na trehalózovém médiu vyšší úmrtnost než na ostatních variantách, a tak tyto účinky trehalózy nejsou pro zvolené druhy škodlivé. Ani změny v metabolismu škrobu nebyly u většiny zahrnutých druhů nijak výrazné, určitě ne srovnatelně s výsledky získanými u huseníčku *A. thaliana* (Wingler *et al.*, 2000; Kolbe *et al.*, 2005). Z tohoto pohledu se pak zdá pravděpodobné, že změny v metabolismu škrobu vyvolané vznikem orchideoidní mykorhizy (Hadley & Purves, 1974; Hadley, 1984) nesouvisí přímo s trehalózovým signálem, ale je dána jinými vlivy provázejícími vznik této symbiózy. U druhu *L. discolor* bylo patrné, že ani inhibice trehalázy nevedla u protokormů k výrazným změnám v bilanci sacharidů, ač ovlivnila všechny ostatní sledované parametry. Tyto protokormy pouze neobsahovaly glukózu, proto se zdá, že štěpení trehalózy před jejím vstupem do buněk není nutné, a že tedy trehalóza může vstupovat do buněk volně, aniž by působila toxicky. Právě velice drastické změny v metabolismu sacharidů jsou pravděpodobně zodpovědné za toxicitu trehalózy u kokotice *C. reflexa* (Veluthambi *et al.*, 1982a) a huseníčku *A. thaliana* (Delatte *et al.*, 2011). Jako pravděpodobnější se tedy zdá být první uvedený scénář, kdy houbová trehalóza je přijímána pomocí dosud neidentifikovaných transportérů do protoplastu a tam teprve metabolizována. Schopnost orchidejí využít trehalózu tímto způsobem, který by jistě v evoluci vyžadoval velké změny na úrovni regulace uhlíkového metabolismu, by s největší pravděpodobností mohl být dán milióny let trvající koevolucí všech orchidejí s mykorhizními houbami.

5.4. Evoluce trehalázových genů v rámci podříše Embryophyta

Schopnost orchidejí využít trehalózu byla v odborné literatuře několikrát doložena, a i tato diplomová práce ukazuje, že s největší pravděpodobností je tato schopnost u orchidejí skutečně běžná. V odborné literatuře bývá na druhou stranu uváděno, že trehalóza není pro rostliny použitelným zdrojem energie a uhlíku. Toto tvrzení je patrně zobecněním pozorování u huseníčku *Arabidopsis thaliana* (např. Wingler *et al.*, 2000; Delatte *et al.*, 2011; Van Houtte *et al.*, 2013) a kokotice *Cuscuta reflexa* (Veluthambi *et al.*, 1981, 1982c), u kterých skutečně trehalóza působí toxicky a není těmito druhy využitelná. Vzhledem k literaturou zcela opomíjeným pozorováním Veluthambiho (1981) je ale velice pravděpodobné, že toto zobecnění neodpovídá skutečnosti. Je možné uvažovat, že u druhů schopných trehalózu využít došlo v průběhu evoluce ke zvýšení počtu paralogů trehalázového genu. Právě sekvenční alignment je vhodnou explorativní metodou, která může vést k nalezení duplikací trehalázových genů, které pak mohou indikovat alternace trehalázového metabolismu. V odborné literatuře bývá podobně jako neschopnost rostlin využít trehalózu zobecňován i počet trehalázových genů na jeden, jako je tomu například u huseníčku *A. thaliana* (Vogel *et al.*, 1998; Avonce *et al.*, 2006). Ve studiích zabývajících se fylogenezí genů trehalázového metabolismu bývá možná právě z tohoto důvodu často trehaláza vynechávána (např. v pracích Mu *et al.*, 2016; Chen & Lou, 2017). A to navzdory tomu, že byla publikována práce ukazující na duplikace tohoto genu u topolu *Populus trichocarpa* a čepenky *Physcomitrella patens* (Lunn, 2007). Tato diplomová práce přináší v tomto ohledu poměrně překvapující informaci o tom, že dvě a více kopií trehalázového genu může mít ve svém genomu ve skutečnosti velká část rostlin. V rámci podříše Embryophyta byl totiž více než jeden paralog trehalázového genu zaznamenán téměř u 30 % zahrnutých druhů rostlin, což poměrně silně indikuje, že význam trehalázy byl možná v odborné literatuře podceňován. Zkonstruovaný fylogenetický strom poměrně dobře ukazuje, že duplikace trehalázového genu nejsou zdaleka jen důsledkem recentních celogenomových duplikací, tedy produktem neopolyploidizace. Je tedy zřejmé, že u řady druhů je přítomnost většího počtu trehalázových genů možná také důsledkem paleopolyploidizace a následné retence zmnožených genů v genomu. V následujícím textu budou opakovaně udávány ploidie druhů rostlin, všechny tyto informace jsou získány z databáze Kew (Kew C-values Database, 2017). Druhým možným vysvětlením je zmnožení genů například segmentální či tandemovou duplikací, případně duplikací způsobenou transpozicí (Freeling, 2009; Magadum *et al.*, 2013). Všechny typy duplikací jsou u rostlin velice časté a většina současných rostlin přitom prošla s největší pravděpodobností mnoha celogenomovými i jinými duplikacemi, což mělo zcela klíčový vliv na jejich evoluci (Masterson, 1994; Chapman *et al.*, 2006; Jaillon *et al.*, 2007; Fawcett *et al.*, 2009; Soltis *et al.*, 2009; Jiao *et al.*, 2011; Murat *et al.*, 2017). Poté, co dojde k duplikaci genu, zpravidla nastává několik možných změn ve vlastnostech vzniklých genů, a to většinou z toho důvodu, aby byly vyrovnány změny v genové dózi. Jednou možností je například vznik pseudogenu, kdy jedna kopie genu přestane být předmětem negativní selekce a většinou dojde k její ztrátě (Magadum *et al.*, 2013). Co se trehalázových genů týče, jeden

pseudogen byl popsán i u druhu zahrnutého v této práci, prstnatce *D. majalis* (Ponert, pers. com, Praha, 2017). Osud pseudogenu může být různý, nejčastěji ovšem dojde k jeho eliminaci z genomu. Jsou ale známy i případy, kdy pseudogeny plní důležitou funkci. Například v imunitě některých živočichů jsou některé pseudogeny využívány v genové konverzi k produkci unikátních nových imunoglobulinů (Ota & Nei, 1995). Takovou úlohu pseudogenu u *D. majalis* je možné si paralelně představit například v produkci proteinů zodpovědných za rozeznání správného mykorhizního partnera. Sekvence zahrnuté v této práci byly ovšem dohledatelné v databázi exprimovaných sekvencí, a tak je nepravděpodobné, že se jedná o pseudogeny. Dalším možným osudem genů po jejich duplikaci je jejich retence v nezměněné podobě. Může jít jednak o tzv. negativní selekci a nebo koncertaci (Magadum *et al.*, 2013). Negativní selekce spočívá v tom, že v kódující sekvenci genu probíhají především synonymní mutace, nepostihující funkci kódovaného proteinu. Tento mechanismus se do značné míry uplatňuje u genů kódujících TPS a TPP (Avonce *et al.*, 2006; Lunn, 2007; Vandesteene *et al.*, 2012). Vzhledem k poměrně časté přítomnosti více než jedné kopie trehalázového genu u rostlin je možné, že i tyto jsou předmětem negativní selekce. Navíc se také trehalázové geny nedělí do tříd, což ukazuje na to, že v minulých érách evoluce rostlin byly tyto geny patrně předmětem negativní selekce. Další možností retence nezměněných genů po duplikaci je jejich tzv. koncertace, kdy jsou geny procesem genové konverze udržovány ve stejné podobě (Nei *et al.*, 2000); tento mechanismus u trehalázových genů rostlin také nelze vyloučit, ovšem jen v případě, že daný druh má dva a více trehalázových genů. Z tohoto pohledu by bylo vhodné do budoucna pro vytvořený sekvenční alignment zjistit poměr mezi synonymními a nesynonymními mutacemi, který by vypovídal o selekci, jaké trehalázové geny rostlin podléhají. Nejčastěji se ovšem geny po své duplikaci specializují časově či prostorově odlišnou expresí, dochází k jejich subfunkcionalizaci (Adams & Wendel, 2005). Do budoucna by bylo vhodné provést u trehalázových genů analýzu regulačních sekvencí a zjistit tak, zda v případě zmnožení trehalázových genů skutečně nedošlo k jejich subfunkcionalizaci. Případně mohou geny po duplikaci vytvářet produkt s jinou funkcí, dochází tedy k jejich neofunkcionalizaci (Des Marais & Rausher, 2008). Žádná dávná neofunkcionalizace však není příliš pravděpodobná, vzhledem k tomu, že trehalázové geny patrně nediverzifikují do tříd.

Řada druhů, u kterých bylo v této práci identifikováno více než dva geny, prošla v nedávné době polyploidizací, jedná se o tzv. neopolyploidní druhy. Nejčastěji se jedná o hospodářsky významné druhy vzniklé hybridizací. Jde například o tabák *N. tabacum*. U tohoto druhu dobře odpovídá počet trehalázových genů počtu trehalázových genů identifikovaných u jeho předpokládaných předků, *N. tomentisifromis* a *N. sylvestris* (Murad *et al.*, 2002). V rámci čeledi Solanaceae je zajímavé rozdělení trehalázových sekvencí do dvou větví, které neodpovídají členění skupiny na podčeledi Nicotianoideae a Solanoideae. To může ukazovat například na to, že celogenomová duplikace, která proběhla v rámci této čeledi před její diverzifikací na podčeledi (Song *et al.*, 2012), dala vznik více trehalázovým genům na druh, k jejich retenci ovšem u podčeledi Solanoideae nedošlo. V rámci čeledi Nicotianoideae proběhla ještě jedna celogenomová duplikace před její diverzifikací (Stø *et al.*, 2015), která se však na současném počtu trehalázových genů

nejspíše nepodepsala. Podobná situace jako u tabáku *N. tabacum*, tedy zvýšení počtu trehalázových genů v důsledku recentní celogenomové duplikace, je například u bavlníku, rod *Gossypium*, který je tetraploidní (Chen & Lou, 2017) a má ve svém genomu patrně dva trehalázové geny. Neopolyploidní je ale například i lilek *Solanum tuberosum*, třtina *Saccharum officinarum*, nebo banánovník *Musa acuminata*, u kterých však byla identifikována pouze jedna trehaláza, a je tak možné, že eliminace trehalázových genů může být i poměrně rychlá. Naopak neopolyploidizace se patrně podepsala na současném počtu trehalázových genů u rodů *Brassica*, či *Camelina*. Zajímavá je situace u čepenky *Physcomitrella patens*. Tento druh je haploidní, a přesto u něho byly identifikovány čtyři geny trehalázy. Jiný autor (Lunn, 2007) identifikoval v genomu *P. patens* tři tyto geny. Jeho práce ale byla publikována ještě před tím, než byl zveřejněn celý genom *P. patens* (prosinec 2007; Rensing *et al.*, 2008), patrně proto jednu sekvenci nenalezl. Trehalázové geny *P. patens* by mohly být produktem dvou dávných celogenomových duplikací (Rensing *et al.*, 2008). Produktem dávných celogenomových duplikací by mohly být například i trehalázové geny diploidních rodů *Populus*, *Manihot*, nebo *Ricinus*, u kterých také proběhly relativně recentní celogenomové duplikace (Cannon *et al.*, 2006; Tuskan *et al.*, 2006). Jednoznačně nejzajímavější je nejen z pohledu této diplomové práce ovšem situace v čeledi Orchidaceae. Zde byla zaznamenána celá řada duplikací, zejména u druhu prstnatce *D. majalis*, u kterého bylo identifikováno 5 paralogů trehalázového genu. Alotetraploidní původ tohoto druhu (Pillon *et al.*, 2007) by mohl vysvětlit existenci dvojic blízce příbuzných paralogů. Přítomnost hlouběji oddělených skupin genů nicméně ukazuje, že tyto geny jsou zde patrně také produktem částečných duplikací genomu či pozůstatkem celogenomových duplikací. Je možné také uvažovat, že takováto proliferace trehalázového genu souvisí například se subfunkcionalizací, či zde dokonce neofunkcionalizací některých paralogů. Případně je možné, že je trehaláza u tohoto druhu jednoduše potřebná ve velkém množství, například v souvislosti s mykoheterotrofním stádiem vývoje. Vyšší, nebo stejný počet genů trehalázy, pokud je mi známo, nemá žádná doposud studovaná rostlina, ani houba, či bakterie. Pouze jeden druh prvoústého živočicha, vírník *Adenita vaga*, má ve svém genomu sedm genů trehaláz, které patrně všechny získal horizontálním genovým přenosem z genomu bakterií (Hespeels *et al.*, 2015). V rámci orchidejí došlo minimálně k jedné relativně recentní celogenomové duplikaci, která byla identifikována z genomu *Phalaenopsis equestris* (Murat *et al.*, 2017). Přesto minimálně u rodu *Phalaenopsis* není s velkou pravděpodobností přítomna více než jedna trehaláza. Genomy dalších zahrnutých druhů orchidejí zatím nejsou osekvenovány, a tak je možné, že u těchto druhů je trehalázových genů více. Na to by mohly ukazovat například sekvence druhu stromobytky *D. catenatum*, které byly zařazeny do dvou podčeledí orchidejí, což by mohlo naznačovat například přítomnost dvou tříd trehalázových genů u orchidejí.

Důležitým výsledkem této práce je, že v rámci Embryophyt nebyly nalezeny žádné velké odlišené třídy genů trehaláz. To je zajímavé zejména v porovnání s geny pro biosyntézu trehalózy. Geny kódující TPS i TPP jsou totiž rozděleny zpravidla do dvou poměrně silně odlišených tříd (Avonce *et al.*, 2006; Lunn, 2007; Yang *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2016; Mu *et al.*, 2016; Chen & Lou, 2017). Přesto je zajímavé hledat souvislost mezi velikostí rodin genů kódujících TPS a TPP a počtem nalezených trehalázových genů u daných druhů.

Například u bavlníku *Gossypium raimondii* byly nalezeny dva geny pro trehalázu. To patrně souvisí s tím, že se jedná o tetraploidní druh a tomu odpovídá i přibližně dvojnásobný počet genů pro TPS u tohoto druhu bavlníku, oproti diploidním druhům bavlníku (Chen & Lou, 2017). Další možná zajímavá souvislost mezi počtem genů pro TPS a TPP a počtem genů pro trehalázu je u manioku *Manihot esculenta*. U tohoto paleopolyploidního druhu byla nalezena jedna nová rodina genů kódujících TPP (Han *et al.*, 2016), což by mohlo souviset se dvěma trehalázovými geny u tohoto druhu. Naopak například u paleopolyploidního topolu *Populus trichocarpa* byly nalezeny tři trehalázové geny a v jeho genomu je patrně přítomno jen 12 genů pro TPS. Bylo by lákavé spekulovat, že zvýšení počtu genů pro TPS či TPP a současné zvýšení počtu trehalázových genů souvisí s udržením genové dóze, podobná domněnka by ale vyžadovala zcela jiné analýzy, než je sekvenční alignment a v tuto chvíli tak nelze o ničem podobném rozhodnout. Případ *G. raimondii* není příliš vypovídající, jelikož se zde jedná o recentní polyploidizaci a to, zda trehalázové geny budou z jeho genomu eliminovány, rozhodnou až další tisíce, či milióny let. Z pohledu této práce by bylo velice přínosné do budoucna nalézt geny kódující TPS a TPP u orchidejí; je možné, že jejich počet bude také určitým způsobem odrážet počet trehalázových genů.

Určitý význam může mít také ten výsledek, že zrekonstruovaná fylogeneze trehalázových genů přibližně kopíruje průběh fylogeneze Embryophyt. Zajímavé jsou z tohoto pohledu zejména právě odchylky, jako například zařazení některých bazálních dvouděložných taxonů rostlin mezi odvozenější dvouděložné rostliny. To může ukazovat například na silnou negativní selekci nebo koncertaci genů v odvozenějších taxonech dvouděložných rostlin. Velice vhodnou metodou pro další studium vytvořeného alignmentu by byla analýza kolinearit v zařazených sekvencích, který by podala informaci především o charakteru duplikací či možné podobě ancestrálních genů trehalázy. Dále by bylo záhodno analyzovat zahrnuté sekvence na konzervované domény, zejména katalytickou doménu, domény pro retenci proteinu ve fosfolipidové membráně či domény pro vazbu regulačních proteinů (Barraza & Sánchez, 2013). Vytvořený sekvenční alignment poskytuje do budoucna materiál pro velkou řadu analýz, jejichž výsledky by mohly umožnit lepší porozumění významu trehalázy i trehalózy u rostlin.

5.4.1. Trehalázové geny a utilizace trehalózy

Duplikace trehalázového genů jsou zdá se mezi rostlinami poměrně časté. Asi prvním možným vysvětlením pro tento fenomén je účast trehaláz na degradaci trehalózy pocházející z nějaké formy symbiózy. Velká část symbiontů rostlin (kromě jiných rostlin) totiž produkuje velké množství trehalózy, a jak již bylo několikrát uvedeno, tato může působit na rostliny toxicky. Ovšem například u orchidejí je možné tuto možnost vyloučit. Druh můrovce *P. equestris* má ve svém genomu patrně jen jednu kopii trehalázy, a přesto bylo u tohoto rodu ukázáno, že je schopen trehalózu utilizovat (Ernst *et al.*, 1971). Podobně i další druhy, u kterých byla schopnost utilizace trehalózy pozorována, jako je například mrkev *D. carota*, nebo kukuřice *Z. mays* (Veluthambi *et al.*, 1981), mají patrně pouze jeden gen pro trehalázu. Nejpravděpodobněji tak více proliferace trehalázového genu u některých taxonů bude mít za výsledek

subfunkcionalizaci, či neofunkcionalizaci proteinů trehalázy. Tyto modifikace ovšem mohou být v souvislosti právě s nějakým typem symbiózy. Trehaláza fungující v pletivech, která by byla v kontaktu se symbiontem, by hypoteticky mohla mít jiné vlastnosti, než jaké by byly vhodné například pro trehalázu fungující v pylové láčce. Jako cíl budoucí práce tedy bude vhodné použít explorativní metody, např. mnohorozměrné analýzy, a hledat možné korelace mezi počtem trehalázových genů v genomu daných druhů a specifiky těchto druhů. Mohlo by se jednat o specifika jako je například typ mykorhizní symbiózy, délka životního cyklu, struktura květu a květenství apod.

6. Závěr

Mykorhizní symbióza představuje nedílnou součást života většiny rostlin a sehrála v jejich evoluci extrémně důležitou roli. Tato symbióza je však důležitá nejen pro samotné rostliny a mykorhizní houby, ale i pro ostatní organismy sdílející s rostlinami společný ekosystém. Pro život orchidejí je tato symbióza zcela nepostradatelná, jelikož orchideje jsou alespoň po část svého života plně mykoheterotrofní, což je umocněno tím, že tímto stádiem orchideje procházejí během první fáze svého vývoje. Vztah a komunikace mezi symbionty v orchideoidní mykorhize jsou v současné době jen velice málo prostudovány a o molekulární podstatě této symbiózy je známo nesrovnatelně méně než u jiných typů mykorhizy. Jednou z látek pravděpodobně přenášených v této symbióze směrem z houby do rostliny je trehalóza, která by tak mohla být nepostradatelným zdrojem energie pro časná vývojová stadia orchidejí.

Všechny druhy orchidejí zastoupené v této práci jsou schopny trehalózu využít a využívat ji tak ke svému růstu a vývoji. Trehalóza je u většiny druhů jakožto zdroj uhlíku a energie pro protokormy zcela srovnatelná se sacharózou a glukózou, které jsou většinou orchidejí snadno využitelné. Pro většinu druhů představuje trehalóza dobrý stimulans pro klíčení a nepůsobuje u nich žádné výrazné odumírání. Na rozdíl od některých jiných rostlin tak pro orchideje trehalóza není toxická. U některých druhů je trehalóza patrně reflektována také jako signál pro změny v uhlíkovém metabolismu, čemuž nasvědčují změny v obsahu endogenních sacharidů. Všechny zahrnuté druhy také extracelulárně štěpí sacharózu i trehalózu.

U kořenů všech zahrnutých druhů orchidejí trehalázová aktivita kolokalizuje s oblastmi kolonizovanými mykorhizní houbou. Zdá se tedy, že trehaláza je nezbytným činitelem na fyzickém rozhraní mezi symbionty v orchideoidní mykorhize. To nasvědčuje ve prospěch hypotézy, že trehalóza je sacharidem přenášeným z houby do orchideje, a že trehaláza se tohoto přenosu účastní.

V rámci čeledi Orchidaceae došlo k několika duplikacím trehalázových genů u podčeledí Orchidoideae a Epidendroideae. K řadě nezávislých duplikací došlo také v rámci podříše Embryophyta. Trehaláza tak je patrně buďto u některých druhů potřebná ve větším množství, pravděpodobně však došlo u proteinu k jeho subfunkcionalizaci, či neofunkcionalizaci. Zdá se proto, že trehaláza může v metabolismu rostlin plnit významnější roli, než jakou jí současná odborná literatura přiznává.

Utilizace trehalózy protokormy orchidejí, společně s kolokalizací trehalázové aktivity s mykorhizními oblastmi v kořenech dospělých orchidejí, a také s duplikací trehalázových genů v odvozených taxonech orchidejí nasvědčují tomu, že trehalóza představuje jednu z důležitých látek přenášených v orchideoidně mykorhizní symbióze směrem z houby do rostliny.

7. Seznam použité literatury

- Adams RP, Kendall E, Kartha KK. 1990.** Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. *Biochemical Systematics and Ecology* **18**: 107–110.
- Adams KL, Wendel JF. 2005.** Allele-specific, bidirectional silencing of an alcohol dehydrogenase gene in different organs of interspecific diploid cotton hybrids. *Genetics* **171**: 2139–2142.
- Aeschbacher RA, Muller J, Boller T, Wiemken A. 1999.** Purification of the trehalase GMTRE1 from soybean nodules and cloning of its cDNA. GMTRE1 is expressed at a low level in multiple tissues. *Plant Physiology* **119**: 489–495.
- Albertorio F, Chapa VA, Chen X, Diaz AJ, Cremer PS. 2007.** The α,α -(1→1) linkage of trehalose is key to anhydrobiotic preservation. *Journal of the American Chemical Society* **129**: 10567–10574.
- Alexander C, Alexander IJ, Hadley G. 1984.** Phosphate uptake by *Goodyera repens* in relation to mycorrhizal infection. *New Phytologist* **97**: 401–411.
- Alexander C, Hadley G. 1984.** The effect of mycorrhizal infection of *Goodyera repens* and its control by fungicide. *New Phytologist* **97**: 391–400.
- Alexander C, Hadley G. 1985.** Carbon Movement between Host and Mycorrhizal Endophyte During the Development of the Orchid *Goodyera repens* Br. *New Phytologist* **101**: 657–665.
- Arditti J. 1992.** *Fundamentals of orchid biology*. New York: John Wiley & Sons.
- Arditti J, Ghani AKA. 2000.** Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* **145**: 367–421.
- Asano N, Takuji Y, Yukihiko K, Katsuhiko M. 1987.** Effect of validamycins on glycohydrolases of *Rhizoctonia solani*. *The Journal of Antibiotics* **40**: 526–532.
- Avonce N, Leyman B, Mascorro-Gallardo JO, Van Dijck P, Thevelein JM, Itu. 2004.** The Arabidopsis Trehalose-6-P Synthase AtTPS1 Gene Is a Regulator of Glucose, Absciscic Acid, and Stress Signaling. *Plant physiology* **136**: 3649–3659.
- Avonce N, Mendoza-Vargas A, Morett E, Iturriaga G. 2006.** Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC evolutionary biology* **6**: 109.
- Azcon R, Ocampo JA. 1984.** Effect of root exudation on VA mycorrhizal infection at early stages of plant growth. *Plant and Soil* **82**: 133–138.
- Bae H, Herman E, Bailey B, Bae HJ, Sicher R. 2005.** Exogenous trehalose alters Arabidopsis transcripts involved in cell wall modification, abiotic stress, nitrogen metabolism, and plant defense. *Physiologia Plantarum* **125**: 114–126.
- Barraza A, Estrada-Navarrete G, Rodriguez-Alegria ME, Lopez-Munguia A, Merino E, Quinto C, Sanchez F. 2013.** Down-regulation of PvTRE1 enhances nodule biomass and bacteroid number in the common bean. *New Phytologist* **197**: 194–206.
- Barraza A, Sánchez F. 2013.** A neglected carbon metabolism regulator ? Trehalases. *Plant signaling & behavior* **e24778**: 1–5.
- Barroso J, Pais MSS. 1987.** Coated Vesicles in the Cytoplasm of the Host Cells in *Ophrys Lutea* Cav. Mycorrhizas (Orchidaceae). *New Phytologist* **105**: 67–70.
- Bartlett MSS. 1952.** Properties of sufficiency and statistical test. *Proceedings of the Royal Statistical Society Series A* **1**: 165–183.
- Belocopitow E, Maréchal LR. 1970.** Trehalose phosphorylase from *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* **198**: 151–154.
- Bertani G. 1951.** Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **62**: 293–300.
- Best M, Koenig K, McDonald K, Schueller M, Rogers A, Ferrieri RA. 2011.** Inhibition of trehalose breakdown increases new carbon partitioning into cellulosic biomass in *Nicotiana tabacum*. *Carbohydrate research* **346**: 595–601.
- Bianchi G, Gamba A, Limiroli R, Pozzi N, Elster R, Salamini F. 1993.** The unusual sugar composition in leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Physiologia Plantarum* **87**: 223–226.
- BLAST. 2017.** BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Accessed on: 2016-2017.
- Blázquez MA, Santos E, Flores C-L, Martínez-Zapater JM, Salinas J, Gancedo C. 1998.** Isolation and Molecular Characterization of the Arabidopsis TPS1 Gene, Encoding Trehalose-6-Phosphate Synthase. *The Plant Journal* **13**: 685–689.
- Bougouire JJ, Brundrett MC, Grierson PF. 2010.** Carbon and nitrogen supply to the underground orchid,

- Rhizanthella gardneri. *New Phytologist* **186**: 947–956.
- Bougoure J, Ludwig M, Brundrett M, Cliff J, Clode P, Kilburn M, Grierson P. 2014.** High-resolution secondary ion mass spectrometry analysis of carbon dynamics in mycorrhizas formed by an obligately myco-heterotrophic orchid. *Plant, Cell and Environment* **37**: 1223–1230.
- Brodmann A, Schuller A, Ludwig-müller J, Aeschbacher RA, Wiemken A, Boller T, Wingler A, Brodmann D, Schuller A, Ludwig-müller J, et al. 2002.** Induction of trehalase in Arabidopsis plants infected with the trehalose-producing pathogen Plasmodiophora brassicae. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **15**: 693–700.
- Brodmann J, Twele R, Francke W, Yi-bo L, Xi-qiang S, Ayasse M. 2009.** Orchid Mimics Honey Bee Alarm Pheromone in Order to Attract Hornets for Pollination. *Current Biology* **19**: 1368–1372.
- Brundrett MC. 2009.** Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: Understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* **320**: 37–77.
- Burgeff H. 1936.** *Samenkeimung der Orchideen und Entwicklung ihrer Keimpflanzen mit einem Anhang über praktische Orchideenzucht*. Jena: Gustav Fischer.
- Cabib E, Leloir LF. 1958.** The biosynthesis of trehalose phosphate. *Journal of Biological Chemistry* **231**: 259–275.
- Cameron DD, Leake JR, Read DJ. 2006.** Mutualistic mycorrhiza in orchids: Evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist* **171**: 405–416.
- Cameron DD, Johnson I, Read DJ, Leake JR. 2008.** Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. *New Phytologist* **180**: 176–184.
- Candy DJ, Kilby B a. 1961.** The biosynthesis of trehalose in the locust fat body. *The Biochemical journal* **78**: 531–536.
- Cannon SB, Sterck L, Rombauts S, Sato S, Cheung F, Gouzy J, Wang X, Mudge J, Vasdewani J, Schiex T, et al. 2006.** Legume genome evolution viewed through the *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 14959–14964.
- Carillo P, Feil R, Gibon Y, Satoh-Nagasawa N, Jackson D, Bläsing OE, Stitt M, Lunn JE. 2013.** A fluorometric assay for trehalose in the picomole range. *Plant methods* **9**: 21.
- Carlson MC. 1940.** Formation of the Seed of *Cypripedium parviflorum*. *Botanical Gazette* **102**: 295–301.
- Clements M. 1995.** Reproductive biology in relation to phylogeny of the Orchidaceae especially in the tribe Diuridae.
- Cookson SJ, Yadav UP, Klie S, Morcuende R, Usadel B, Lunn JE, Stitt M. 2016.** Temporal kinetics of the transcriptional response to carbon depletion and sucrose readdition in Arabidopsis seedlings. : 768–786.
- da Costa Morato Nery D, da Silva CG, Mariani D, Fernandes PN, Pereira MD, Panek AD, Eleutherio EC a. 2008.** The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1780**: 1408–1411.
- Crowe JH, Crowe LM, Chapman D. 1984.** Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* **223**: 701–703.
- Darwin C. 1904.** *The Various Contrivances by Which Orchids are Fertilised by Insects*. London: John Murray.
- Dekkers BJW, Schuurmans JAMJ, Smeekens SCM. 2004.** Glucose delays seed germination in Arabidopsis thaliana. *Planta* **218**: 579–588.
- Delatte TL, Sedijani P, Kondou Y, Matsui M, de Jong GJ, Somsen GW, Wiese-Klinkenberg A, Primavesi LF, Paul MJ, Schluepmann H. 2011.** Growth Arrest by Trehalose-6-Phosphate: An Astonishing Case of Primary Metabolite Control over Growth by Way of the SnRK1 Signaling Pathway. *Plant Physiology* **157**: 160–174.
- Delorge I, Figueroa CM, Feil R, Lunn JE, Van Dijck P. 2015.** Trehalose-6-phosphate synthase 1 is not the only active TPS in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* **466**: 283–290.
- Deveau a., Brulé C, Palin B, Champmartin D, Rubini P, Garbaye J, Sarniguet A, Frey-Klett P. 2010.** Role of fungal trehalose and bacterial thiamine in the improved survival and growth of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N and the helper bacterium *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8. *Environmental Microbiology Reports* **2**: 560–568.
- Devos S, Vissenberg K, Verbelen J, Prinsen E. 1997.** Infection of Chinese cabbage by *Plasmodiophora brassicae* leads to a stimulation of plant growth : impacts on cell wall metabolism and hormone balance. : 241–250.
- van Dijken AJH, Schluepmann H, Smeekens SCM. 2004.** Arabidopsis trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant physiology* **135**: 969–977.
- Dormer KJ, Street HE. 1949.** The Carbohydrate Nutrition of Tomato Roots. *Annals of Botany* **13**: 199–217.
- Dostálová M. 2016.** *Utilizace vybraných sacharidů houbového původu orchidejemi a jejich možný přenos v mykorrhize*. Diploma thesis. Charles University in Prague, Department of Experimental Plant Biology.
- Drennan PM, Smith MT, Goldsworthy D, van Staden J. 1993.** The occurrence of trehalose in the leaves of the

desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* welw. *Journal of Plant Physiology* **142**: 493–496.

Duplessis S, Courty P-E, Tagu D, Martin F. 2005. Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. *New Phytologist* **165**: 599–611.

Eastmond PJ, van Dijken AJH, Spielman M, Kerr A, Tissier AF, Dickinson HG, Jones JDG, Smeekens SC, Graham IA. 2002. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *The Plant Journal* **29**: 225–235.

Eis C, Watkins M, Prohaska T, Nidetzky B. 2001. Fungal trehalose phosphorylase: kinetic mechanism, pH-dependence of the reaction and some structural properties of the enzyme from *Schizophyllum commune*. *Biochem J* **356**: 757–767.

El-Bashiti T, Yu M, Hamamci H, Öktem HA, Yücel M, Hamamci H, Öktem HA, Yücel M. 2005. Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. *Plant Science* **169**: 47–54.

Elbein AD. 1967. Carbohydrate metabolism in streptomycetes. II. Isolation and enzymatic synthesis of trehalose. *Journal of Bacteriology* **94**: 1520–1524.

Elbein AD. 1968. Trehalose phosphate synthesis in *Streptomyces hygroscopicus*: purification of guanosine diphosphate D-glucose: D-glucose-6-phosphate 1-glucosyl-transferase. *Journal of Bacteriology* **96**: 1623–1631.

Ernst R, Arditti J, Healey PL. 1971. Carbohydrate Physiology of Orchid Seedlings. II. Hydrolysis and Effects of Oligosaccharides. *American Journal of Botany* **58**: 827–835.

Etemadi M, Gutjahr C, Couzigou J-M, Zouine M, Lauressergues D, Timmers A, Audran C, Bouzayen M, Bécard G, Combier J. 2014. Auxin Perception Is Required for Arbuscule Development in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Plant Physiology* **166**: 281–292.

Fawcett JA, Maere S, Van de Peer Y. 2009. Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 5737–5742.

Fay MF, Chase MW. 2009. Orchid biology: From Linnaeus via Darwin to the 21st century. *Annals of Botany* **104**: 359–364.

Fernandez O, Béthencourt L, Quero A, Sangwan RS, Clément Christophe C. 2010. Trehalose and plant stress responses: Friend or foe? *Trends in Plant Science* **15**: 409–417.

Figuerola CM, Feil R, Ishihara H, Watanabe M, Kölling K, Krause U, Höhne M, Encke B, Plaxton WC, Zeeman SC, et al. 2016. Trehalose 6-phosphate coordinates organic and amino acid metabolism with carbon availability. *Plant Journal* **85**: 410–423.

Figuerola CM, Lunn JE. 2016. A Tale of Two Sugars : Trehalose 6-Phosphate and. *Plant physiology* **172**: 7–27.

Fisher RA. 1922. On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society* **85**: 87–94.

Foster AJ, Jenkinson JM, Talbot NJ. 2003. Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *EMBO Journal* **22**: 225–235.

Fox J. 2016. Using the R Commander: A Point-and-Click Interface for R. *CRC Press* **75**: 233.

Freeling M. 2009. Bias in Plant Gene Content Following Different Sorts of Duplication: Tandem, Whole-Genome, Segmental, or by Transposition. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 433–453.

Frison M, Parrou JL, Guillaumot D, Masquelier D, François J, Chaumont F, Batoko H. 2007. The *Arabidopsis thaliana* trehalase is a plasma membrane-bound enzyme with extracellular activity. *FEBS letters* **581**: 4010–4016.

Gamm M, Héloir M-C, Bligny R, Vaillant-Gaveau N, Trouvelot S, Alcaraz G, Frettinger P, Clément C, Pugin A, Wendehenne D, et al. 2011. Changes in carbohydrate metabolism in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **24**: 1061–1073.

Garapati P, Feil R, Lunn JE, Van Dijck P, Balazadeh S, Mueller-Roeber B. 2015. Transcription Factor *Arabidopsis* Activating Factor1 Integrates Carbon Starvation Responses with Trehalose Metabolism. *Plant physiology* **169**: 379–90.

García NAT, Iribarne C, López M, Herrera-cervera JA, Lluch C. 2005. Physiological implications of trehalase from *Phaseolus vulgaris* root nodules : partial purification and characterization. **43**: 355–361.

Gebauer G, Preiss K, Gebauer AC, Authors T, Phytologist N, Trust NP. 2016. Partial mycoheterotrophy is more widespread among orchids than previously assumed. *New Phytologist* **211**: 11–15.

Geelen D, Royackers K, Vanstraelen M, De Bus M, Inzé D, Van Dijck P, Thevelein JM, Leyman B. 2007. Trehalose-6-P synthase AtTPS1 high molecular weight complexes in yeast and *Arabidopsis*. *Plant Science* **173**: 426–437.

Ghosh S, Basu PS. 2006. Production and metabolism of indole acetic acid in roots and root nodules of *Phaseolus mungo*. *Microbiological Research* **161**: 362–366.

- Gibson RP, Gloster TM, Roberts S, Warren RAJ, Storch De Gracia I, García Á, Chiara JL, Davies GJ, Gracia IS De, Chiara JL, et al. 2007.** Molecular basis for trehalase inhibition revealed by the structure of trehalase in complex with potent inhibitors. *Angewandte Chemie - International Edition* **46**: 4115–4119.
- Gill PK, Sharma AD, Singh P, Bhullar SS. 2002.** Osmotic Stress-Induced Changes in Germination, Growth and Soluble Sugar Content of Sorghum Bicolor (L.) Moench Seeds. *Growth (Lakeland)* **28**: 12–25.
- Girlanda M, Segreto R, Cafasso D, Liebel HT, Rodda M, Ercole E, Cozzolino S, Gebauer G, Perotto S. 2011.** Photosynthetic Mediterranean meadow orchids feature partial mycoheterotrophy and specific mycorrhizal associations. *American Journal of Botany* **98**: 1148–1163.
- Givnish TJ, Spalink D, Ames M, Lyon SP, Hunter SJ, Zuluaga A, Iles WJD, Clements MA, Arroyo MTK, Leebensmack J, et al. 2015.** Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **282**: 20151553.
- Glasziou KT, Gayler KR. 1969.** Sugar transport: Occurrence of trehalase activity in sugar cane. *Planta* **85**: 299–302.
- Gómez LD, Baud S, Gilday A, Li Y, Graham IA. 2006.** Delayed embryo development in the ARABIDOPSIS TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE 1 mutant is associated with altered cell wall structure, decreased cell division and starch accumulation. *Plant Journal* **46**: 69–84.
- Gravot A, Grillet L, Wagner G, Jubault M, Lariagon C, Baron C, Deleu C, Delourme R, Bouchereau A, Manzanares-Dauleux MJ. 2011.** Genetic and physiological analysis of the relationship between partial resistance to clubroot and tolerance to trehalose in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist* **191**: 1083–1094.
- Gryndler M, Baláž M, Hršelová H, Jansa J, Vosátka M. 2004.** *Mykorhizní symbióza : o soužití hub s kořeny rostlin*. Praha: Academia.
- Guo S, Xu J. 1990.** Studies on the changes of cell ultrastructure in the course of seed germination of Bletilla striata under fungus infection conditions. *Acta Botanica Sinica* **32**: 594–598.
- Gussin AES, McCormack JH. 1970.** Trehalase and the enzymes of trehalose biosynthesis in Lilium longiflorum pollen. *Phytochemistry* **9**: 1915–1920.
- Gussin a E, McCormack JH, Waung LY, Gluckin DS. 1969.** Trehalase: a new pollen enzyme. *Plant physiology* **44**: 1163–1168.
- Hadley G. 1984.** Uptake of [14C]glucose by asymbiotic and mycorrhizal orchid protocorms. *New Phytologist* **96**: 263–273 EP-.
- Hadley G, Purves S. 1974.** Movement of 14Carbon from host to fungus in orchid mycorrhiza. *New Phytologist* **73**: 475–482.
- Hall T. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95–98.
- Hammerton R, Smith M, Vanstaden J. 1989.** Factors influencing seed variability and germination in Hypoxis hemerocallidea Fish and Meyer. *Seed science and technology* **17**: 613–624.
- Hammerton RD, van Staden J. 1988.** Seed germination of Hypoxis hemerocallidea. *South African Journal of Botany* **54**: 277–280.
- Han B, Fu L, Zhang D, He X, Chen Q, Peng M, Zhang J. 2016.** Interspecies and intraspecies analysis of trehalose contents and the biosynthesis pathway gene family reveals crucial roles of trehalose in osmotic-stress tolerance in cassava. *International Journal of Molecular Sciences* **17**: 1–18.
- Hanahan D. 1983.** Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557–580.
- Harrison CR. 1977.** Physiological Changes During the Germination of Cattleya aurantiaca (Orchidaceae). *Botanical Gazette* **139**: 180–189.
- Harvais G. 1974.** Notes on the biology of some native orchids of Thunder Bay, their endophytes and symbionts. *Canadian Journal of Botany* **52**: 451–460.
- Healey PL, Michaud JD, Arditti J. 1980.** Morphometry of Orchid Seeds. III. Native California and Related Species of Goodyera, Piperia, Platanthera and Spiranthes. *American Journal of Botany* **67**: 508–518.
- Hespeels B, Li X, Flot JF, Pigneur LM, Malaisse J, Da Silva C, Van Doninck K. 2015.** Against all odds: Trehalose-6-phosphate synthase and trehalase genes in the bdelloid rotifer adineta vaga were acquired by horizontal gene transfer and are upregulated during desiccation. *PLoS ONE* **10**: 1–23.
- Hodge S, Ward JL, Beale MH, Bennett M, Mansfield JW, Powell G. 2013.** Aphid-induced accumulation of trehalose in Arabidopsis thaliana is systemic and dependent upon aphid density. *Planta* **237**: 1057–1064.
- Horlacher R, Uhland K, Klein W, Ehrmann M, Boos W. 1996.** Characterization of a cytoplasmic trehalase of Escherichia coli. *Journal of Bacteriology* **178**: 6250–6257.
- Van Houtte H, Vandesteene L, López-Galvis L, Lemmens L, Kissel E, Carpentier S, Feil R, Avonce N, Beeckman T, Lunn JE, et al. 2013.** Overexpression of the Trehalase Gene AtTRE1 Leads to Increased Drought Stress

Tolerance in Arabidopsis and Is Involved in Absciscic Acid-Induced Stomatal Closure. *Plant Physiology* **161**: 1158–1171.

Hřibová E, Holubová K, Trávníček P, Petrovská B, Ponert J, Šimková H, Kubátová B, Jersáková J, Čurn V, Suda J, et al. 2016. The Enigma of Progressively Partial Endoreplication: New Insights Provided by Flow Cytometry and Next-Generation Sequencing. *Genome biology and evolution* **8**: 1996–2005.

Chang CW, Bandurski RS. 1964. Exocellular Enzymes of Corn Roots. *Plant Physiology* **39**: 60–4.

Chang PL, Morrison PE. 1975. Histochemical localization of trehalase activity in dorsal flight muscle of the flesh fly *Sarcophaga bullata* with light and electron microscopy. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **23**: 800–807.

Chao YT, Yen SH, Yeh JH, Chen WC, Shih MC. 2017. Orchidstra 2.0-A transcriptomics resource for the orchid family. *Plant and Cell Physiology* **58**: e9.

Chapman B a, Bowers JE, Feltus F a, Paterson AH. 2006. Buffering of crucial functions by paleologous duplicated genes may contribute cyclicality to angiosperm genome duplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 2730–2735.

Chary SN, Hicks GR, Choi YG, Carter D, Raikhel N V. 2007. Trehalose-6-Phosphate Synthase/Phosphatase Regulates Cell Shape and Plant Architecture in Arabidopsis. *Plant Physiology* **146**: 97–107.

Chase MW, Christenhusz MJM, Fay MF, Byng JW, Judd WS, Soltis DE, Mabberley DJ, Sennikov AN, Soltis PS, Stevens PF, et al. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181**: 1–20.

Chen J, Liu SS, Kohler A, Yan B, Luo HM, Chen XM, Guo SX. 2017. iTRAQ and RNA-Seq Analyses Provide New Insights into Regulation Mechanism of Symbiotic Germination of *Dendrobium officinale* Seeds (Orchidaceae). *Journal of Proteome Research*: acs.jproteome.6b00999.

Chen Z, Lou J. 2017. Identification and expression of the trehalose-6-phosphate synthase gene family members in tomato exposed to different light spectra. *Archives of biological sciences* **69**: 93–101.

Ilhan S, Ozdemir F, Bor M. 2015. Contribution of trehalose biosynthetic pathway to drought stress tolerance of *Capparis ovata* Desf. *Plant biology (Stuttgart, Germany)* **17**: 402–7.

Ishihara R, Taketani S, Sasai-takedatsu M, Kino M, Tokunaga R, Kobayashi Y. 1997. Molecular cloning , sequencing and expression of cDNA encoding human trehalase 1. **202**: 69–74.

Iwaya-Inoue M, Takata M. 2001. Trehalose plus chloramphenicol prolong the vase life of tulip flowers. *HortScience* **36**: 946–950.

Jaillon O, Aury J-M, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, et al. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**: 463–467.

Jang I-C, Oh S-J, Seo J-S, Choi W-B, Song SI, Kim CH, Kim YS, Seo H-S, Choi Y Do, Nahm BH, et al. 2003. Expression of a bifunctional fusion of the Escherichia coli genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant physiology* **131**: 516–24.

Jensen MK, Lindemose S, Masi F De, Reimer JJ, Nielsen M, Perera V, Workman CT, Turck F, Grant MR, Mundy J, et al. 2013. ATAF1 transcription factor directly regulates abscisic acid biosynthetic gene NCED3 in Arabidopsis thaliana. *FEBS Open Bio* **3**: 321–327.

Jheng FY, Do YY, Liauh YW, Chung JP, Huang PL. 2006. Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of *Oncidium 'Gower Ramsey'* by adjusting carbohydrate sources. *Plant Science* **170**: 1133–1140.

Jiao Y, Wickett NJ, Ayyampalayam S, Chanderbali AS, Landherr L, Ralph PE, Tomsho LP, Hu Y, Liang H, Soltis PS, et al. 2011. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature* **473**: 97–100.

Johansson VA, Müller G, Eriksson O, Gregor M, Eriksson O. 2014. Dust seed production and dispersal in Swedish Pyroleae species. *Nordic Journal of Botany* **32**: 209–214.

Johnson NC, Graham JH, Smith FA. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* **135**: 575–586.

Johnson D, Leake JR, Read DJ. 2002. Transfer of recent photosynthate into mycorrhizal mycelium of an upland grassland: Short-term respiratory losses and accumulation of ¹⁴C. *Soil Biology and Biochemistry* **34**: 1521–1524.

Julou T, Burghardt B, Gebauer G, Berveiller D, Damesin C, Selosse MA. 2005. Mixotrophy in orchids: Insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytologist* **166**: 639–653.

Kaplan F, Kopka J, Haskell DW, Zhao W, Schiller KC, Gatzke N, Sung DY, Guy CL, Molecular P, Program CB, et al. 2004. Exploring the Temperature-Stress Metabolome. *Plant physiology* **136**: 4159–4168.

- Karim S, Aronsson H, Ericson H, Pirhonen M, Leyman B, Welin B, Mäntylä E, Palva ET, Van Dijck P, Holmström KO. 2007. Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose. *Plant Molecular Biology* **64**: 371–386.
- Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 772–780.
- Kendall E, Adams RP, Kartha KK. 1990. Trehalase activity in plant tissue cultures. *Phytochemistry* **29**: 2525–2528.
- Kerner R, Delgado-Eckert E, Del Castillo E, Müller-Starck G, Peter M, Kuster B, Tisserant E, Pritsch K. 2012. Comprehensive proteome analysis in *Cenococcum geophilum* Fr. as a tool to discover drought-related proteins. *Journal of Proteomics* **75**: 3707–3719.
- Kew C-values Database 2017. 2017. Royal Botanic Gardens, Kew: Plant DNA C-values database. <http://data.kew.org/cvalues/>. Accessed on: June - July 2017.
- Kibbe WA. 2007. OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research* **35**: 43–46.
- Kizawa H, Miyagawa K, Sugiyama Y. 1995. Purification and characterization of trehalose phosphorylase from *Micrococcus varians*. *Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry* **59**: 1908–1912.
- Knudson L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette* **73**: 1–25.
- Knudson L. 1924. Further Observations on Nonsymbiotic Germination of Orchid Seeds. *Botanical Gazette* **77**: 212–219.
- Kocyan A, Snijman DA, Forest F, Devey DS, Freudenstein J V, Chase MW, Rudall PJ, Wiland-szyman J. 2011. Molecular phylogenetics of Hypoxidaceae – Evidence from plastid DNA data and inferences on morphology and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **60**: 122–136.
- Kohler A, Kuo A, Nagy LG, Morin E, Barry KW, Buscot F, Canbäck B, Choi C, Cichocki N, Clum A, *et al.* 2015. Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nature Genetics* **47**: 410–5.
- Koch EM, Koch FC. 1925. The presence of trehalose in yeast. *Science* **61**: 570–2.
- Kolbe A, Tiessen A, Schluepmann H, Paul M, Ulrich S, Geigenberger P. 2005. Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 11118–11123.
- Kopecka M, Kosek D, Kukacka Z, Rezabkova L, Man P, Novak P, Obsil T, Obsilova V. 2014. Role of the EF-hand-like motif in the 14-3-3 protein-mediated activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Journal of Biological Chemistry* **289**: 13948–13961.
- Kord AEM, Youssef A-EE-H, Ahmed HE, Qaid EAA. 2012. Purification and Some Properties of Trehalase from *Triticum aestivum* Seeds. *Egypt. J. Bot.* **2**: 19–36.
- Kord M, Youssef E, Ahmed H, Qaid E. 2013. Purification and characterization of trehalase from seeds of chickpea (*Cicer arietinum* L.). : 661–669.
- Kouril T, Zaparty M, Marrero J, Brinkmann H, Siebers B. 2008. A novel trehalose synthesizing pathway in the hyperthermophilic Crenarchaeon *Thermoproteus tenax*: the unidirectional TreT pathway. *Archives of microbiology* **190**: 355–69.
- Kruskal WH, Wallis WA. 1952. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association* **47**: 583–621.
- Kuga Y, Sakamoto N, Yurimoto H. 2014. Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal pelotons transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms. *The New phytologist* **202**: 594–605.
- Kumar V, Moyo M, Staden J Van, Van Staden J. 2017. Somatic embryogenesis in *Hypoxis hemerocallidea*: An important African medicinal plant. *South African Journal of Botany* **108**: 331–336.
- Laurans F, Pepin R, Gay G. 2001. Fungal auxin overproduction affects the anatomy of *Hebeloma cylindrosporum*-*Pinus pinaster* ectomycorrhizas. *Tree physiology* **21**: 533–540.
- Le BH, Cheng C, Bui AQ, Wagmaister JA, Henry KF, Pelletier J, Kwong L, Belmonte M, Kirkbride R, Horvath S, *et al.* 2010. Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 8063–8070.
- Leake JR. 1994. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist* **127**: 171–216.
- Leake JR, Cameron DD, Beerling, David J. 2008. Fungal fidelity in the myco-heterotroph-to-autotroph life cycle of Lycopodiaceae: a case of parental nurture? *New Phytologist* **177**: 572–576.
- Lee Y, Lu C, Chung MC. 2007. Developmental Changes in Endogenous Abscissic Acid Concentrations and Asymbiotic Seed Germination of a Terrestrial Orchid, *Calanthe tricarinata* Lindl. *Journal of the ...* **132**: 246–252.
- Lee YI, Yeung EC, Lee N, Chung MC. 2006. Embryo development in the lady's slipper orchid, *Paphiopedilum delenatii*, with emphasis on the ultrastructure of the suspensor. *Annals of Botany* **98**: 1311–1319.
- Leloir LF, Cabib E. 1953. The enzymic synthesis of trehalose phosphate. *Journal of the American Chemical*

Society **75**: 5445–5446.

Lewis DH, Harley JL. 1965a. Carbohydrate physiology of mycorrhizal roots of beech. III. Movement of sugars between host and fungus. *New Phytologist* **64**: 256–269.

Lewis DH, Harley JL. 1965b. Carbohydrate physiology of mycorrhizal roots of beech. I. Identity of endogenous sugars and utilization of exogenous sugars. *New Phytologist* **64**: 224–237.

Lewis DH, Smith DC. 1967. Sugar Alcohols (Polyols) in Fungi and Green Plants. I. Distribution, Physiology and Metabolism. *New Phytologist* **66**: 143–184.

Leyman B, Van Dijck P, Thevelein JM. 2001. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends in Plant Science* **6**: 510–513.

Li Y, Li LL, Fan RC, Peng CC, Sun HL, Zhu SY, Wang XF, Zhang LY, Zhang DP. 2012. Arabidopsis sucrose transporter SUT4 interacts with cytochrome b5-2 to regulate seed germination in response to sucrose and glucose. *Molecular Plant* **5**: 1029–1041.

Li X, Nakagawa N, Sakurai N. 2008. Purification and Biochemical Characterization of Cell Wall-bound Trehalase from Pericarp Tissues of *Actinidia deliciosa*. **77**: 229–235.

Liu TH a, Lin JJ, Wu RY. 2006. The effects of using trehalose as a carbon source on the proliferation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* protocorm-like-bodies. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **86**: 125–129.

López MF, Männer P, Willmann A, Hampp R, Nehls U. 2007. Increased trehalose biosynthesis in Hartig net hyphae of ectomycorrhizas. *New Phytologist* **174**: 389–398.

Lugtenberg BJJ, Kravchenko L V, Simons M. 1999. Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environmental microbiology* **1**: 439–446.

Lunn JE. 2007. Gene families and evolution of trehalose metabolism in plants. *Functional Plant Biology* **34**: 550–563.

Lunn JE, Delorge I, Mar C, Dijck P Van, Stitt M, Figueroa CM, Van Dijck P, Stitt M. 2014. Trehalose metabolism in plants. *Plant Journal* **79**: 544–567.

Lunn JEE, Feil R, Hendriks JHM, Gibon Y, Morcuende R, Osuna D, Scheible W-R, Carillo P, Hajirezaei M-R, Stitt M. 2006. Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* **397**: 139–148.

Macakova E, Kopecka M, Kukacka Z, Veisova D, Novak P, Man P, Obsil T, Obsilova V. 2013. Structural basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1830**: 4491–4499.

Madden T. 2013. The BLAST sequence analysis tool. *The BLAST Sequence Analysis Tool*: 1–17.

Magadum S, Banerjee U, Murugan P, Gangapur D, Ravikesavan R. 2013. Gene duplication as a major force in evolution. *Journal of Genetics* **92**: 155–161.

Mailer J, Xie Z, Staehelin C, Mebor RB, Bouer T, Wiemken A, Müller J, Xie, Zhi-Ping P, Staehelin C, Mellor RB, et al. 1994. Trehalose and trehalase in root nodules from various legumes. *Physiologia Plantarum* **90**: 86–92.

Manning JC, Van Staden J. 1987. The development and mobilisation of seed reserves in some African Orchids. *Australian Journal of Botany* **35**: 343–353.

Des Marais DL, Rausher MD. 2008. Escape from adaptive conflict after duplication in an anthocyanin pathway gene. *Nature* **454**: 762–765.

Martins MCM, Hejazi M, Fettke J, Steup M, Feil R, Krause U, Arrivault S, Vosloh D, Figueroa CM, Ivakov A, et al. 2013. Feedback Inhibition of Starch Degradation in Arabidopsis Leaves Mediated by Trehalose 6-Phosphate. *Plant Physiology* **163**: 1142–1163.

Masterson J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* **264**: 421–424.

McCormick MK, Whigham DF, O'Neill J. 2004. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist* **163**: 425–438.

McKendrick SL, Leake JR, Read DJ. 2000. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: Transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. *New Phytologist* **145**: 539–548.

Meixner C, Ludwig-müller J, Miersch O, Gresshoff P, Staehelin C, Vierheilig H, Planta S, November N, Meixner C, Otto JL. 2016. Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant nts1007 Linked references are available on JSTOR for this article : Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormon supernodulating soybean mutant nts100. **222**: 709–715.

Miyoshi K, Mii M. 1988. Ultrasonic treatment for enhancing seed germination of terrestrial orchid, *Calanthe discolor*, in asymbiotic culture. *Scientia Horticulturae* **35**: 127–130.

- Mu M, Lu X, Wang J, Wang D, Yin Z, Wang S, Fan W, Ye W. 2016.** Genome-wide Identification and analysis of the stress-resistance function of the TPS (Trehalose-6-Phosphate Synthase) gene family in cotton. : 1–11.
- Müller J, Aeschbacher RA, Sprenger N, Boller T, Wiemken A. 2000.** Disaccharide-mediated regulation of sucrose:fructan-6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley leaves. *Plant physiology* **123**: 265–274.
- Müller J, Aeschbacher RA, Wingler A, Boller T, Wiemken A. 2001.** Trehalose and trehalase in Arabidopsis. *Plant physiology* **125**: 1086–1093.
- Müller J, Boller T, Wiemken A. 1995a.** Effects of validamycin A, a potent trehalase inhibitor, and phytohormones on trehalose metabolism in roots and root nodules of soybean and cowpea. *Planta* **197**: 362–368.
- Müller J, Boller T, Wiemken A. 1998.** Trehalose affects sucrose synthase and invertase activities in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) roots. *Journal of Plant Physiology* **153**: 255–257.
- Müller J, Boller T, Wiemken A, Müller J, Boller T, Wiemken A. 1995b.** Effects of validamycin A, a potent trehalase inhibitor, and phytohormones on trehalose metabolism in roots and root nodules of soybean and cowpea. *Planta* **197**: 362–368.
- Müller J, Staehelin C, Boller T, Müller J, Xie Z-P, Staehelin C, Boller T, Wiemken A. 1994a.** Effects of Nitrate on Accumulation of Trehalose and other Carbohydrates and on Trehalase Activity in Soybean Root Nodules. *Journal of Plant Physiology* **143**: 153–160.
- Müller J, Staehelin C, Mellor RB, Boller T, Wiemken A. 1992.** Partial purification and characterization of trehalase from soybean nodules. *Journal of Plant Physiology* **140**: 8–13.
- Müller J, Xie ZP, Staehelin C, Mellor RB, Boller T, Wiemken A. 1994b.** Trehalose and Trehalase in Root-Nodules from Various Legumes. *Physiol Plantarum* **90**: 86–92.
- Murad L, Yoong Lim K, Christopodoulou V, Matyasek R, Lichtenstein CP, Kovarik A, Leitch AR. 2002.** The origin of tobacco's T genome is traced to a particular lineage within *Nicotiana tomentosiformis* (Solanaceae). *American Journal of Botany* **89**: 921–928.
- Murat F, Armero A, Pont C, Klopp C, Salse J. 2017.** Reconstructing the genome of the most recent common ancestor of flowering plants. *Nature Genetics*: 1–9.
- Nei M, Rogozin IB, Piontkivska H. 2000.** Purifying selection and birth-and-death evolution in the ubiquitin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10866–10871.
- Niederer M, Pankow W, Wiemken A. 1989.** Trehalose synthesis in mycorrhiza of Norway spruce: an indicator of vitality. *European Journal of ...* **19**: 14–20.
- O'Hara LE, Paul MJ, Wingler A. 2013.** *How do sugars regulate plant growth and development? New insight into the role of trehalose-6-phosphate.*
- O'Neill BP, Purnell MP, Nielsen LK, Brumbley SM. 2012.** RNAi-mediated abrogation of trehalase expression does not affect trehalase activity in sugarcane. *SpringerPlus* **1**: 74.
- Ocón A, Hampp R, Requena N. 2007.** Trehalose turnover during abiotic stress in arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **174**: 879–891.
- Ogura-Tsujita Y, Yokoyama J, Miyoshi K, Yukawa T. 2012.** Shifts in mycorrhizal fungi during the evolution of autotrophy to mycoheterotrophy in *Cymbidium* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **99**: 1158–1176.
- Orchidaceae D, Pillon Y, Fay MF, Hedrén M, Bateman RM, Devey DS, Shipunov AB, Bank M Van Der, Chase MW, Devey S, et al. 2014.** All use subject to JSTOR Terms and Conditions Evolution and temporal diversification of western European polyploid. *Journal of Biological Research* **56**: 1185–1208.
- Ota T, Nei M. 1995.** Evolution of immunoglobulin VH pseudogenes in chickens. *Mol Biol Evol* **12**: 94–102.
- Otsubo M, Iwaya-Inoue M. 2000.** Trehalose Delays Senescence in Cut Gladiolus Spikes. *HortScience* **35**: 1107–1110.
- Park JY, Lee DS, Chung H-J. 2013.** The trehalase gene AtTRE1 is involved in flower development and plant growth in Arabidopsis. *Plant Biosystems* **147**: 387–396.
- Paul MJ, Jhurrea D, Zhang Y, Primavesi LF, Delatte T, Schluepmann H, Wingler A. 2010.** Upregulation of biosynthetic processes associated with growth by trehalose 6-phosphate. *Plant signaling & behavior* **5**: 386–392.
- Paul MJ, Primavesi LF, Jhurrea D, Zhang Y. 2008.** Trehalose Metabolism and Signaling. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 417–441.
- Pego J V, Weisbeek PJ, Smeekens SC. 1999.** Mannose inhibits Arabidopsis germination via a hexokinase-mediated step. *Plant physiology* **119**: 1017–1023.
- Pellny TK, Ghannoum O, Conroy JP, Schluepmann H, Smeekens S, Andralojc J, Krause KP, Goddijn O, Paul MJ. 2004.** Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis. *Plant Biotechnology Journal* **2**: 71–82.

- Pereira MC, Rocha DI, Veloso TGR, Pereira OL, Francino DMT, Meira RMSA, Kasuya MCM. 2015.** Characterization of seed germination and protocorm development of *Cyrtopodium glutiniferum* (Orchidaceae) promoted by mycorrhizal fungi *Epulorhiza* spp. *Acta Botanica Brasílica* **29**: 567–574.
- Peterson RL, Massicotte HB, Melville LH. 2004.** *Mycorrhizas : anatomy and cell biology*. Ottawa: NRC Research Press.
- Piazza A, Zimaro T, Garavaglia BS, Ficarra FA, Thomas L, Marondedze C, Feil R, Lunn JE, Gehring C, Ottado J, et al. 2015.** The dual nature of trehalose in citrus canker disease : a virulence factor for *Xanthomonas citri* subsp . *citri* and a trigger for plant defence responses. **66**: 2795–2811.
- Pillon Y, Fay MF, Hedrén M, Bateman RM, Devey DS, Shipunov AB, Bank M Van Der, Chase MW, Devey S, Fay F, et al. 2007.** Evolution and temporal diversification of western European polyploid species complexes in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *TAXON* **56**: 1185–1208.
- Ponert J. 2009.** *Rané fáze vývoje semen terestrických orchidejí: vliv sacharidů a fytohormonů*. Diploma thesis. Charles University in Prague, Department of Experimental Plant Biology.
- Ponert J, Figura T, Vosolsobě S, Lipavská H, Vohník M, Jersáková J. 2013.** Asymbiotic germination of mature seeds and protocorm development of *Pseudorchis albida* (Orchidaceae) are inhibited by nitrates even at extremely low concentrations. *Botany* **91**: 662–670.
- Ponert J, Lipavská H. 2017.** Utilization of exogenous saccharides by protocorms of two terrestrial orchids. *Plant, Soil and Environment* **63**: 152–158.
- Ponert J, Vosolsobě S, Kmencová K, Lipavská H. 2011.** European orchid cultivation - from seed to mature plant. *European Journal of Environmental Sciences* **1**: 95–107.
- Prajapati HA, Darshan HP, Saurabh RM, Subramanian RB. 2003.** Direct in vitro regeneration of *Curculigo orchoides* Gaertn ., an endangered anticarcinogenic herb. *Current science* **84**: 747–749.
- Price J, Li T-C, Kang SG, Na JK, Jang JC. 2003.** Mechanisms of glucose signaling during germination of *Arabidopsis*. *Plant physiology* **132**: 1424–1438.
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN. 1999.** *Genera Orchidacearum: vol. 1. General introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae*. Oxford: Oxford University Press.
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN. 2003.** *Genera orchidacearum Volume 3 Orchidoideae (Part two), Vanilloideae*. New York: Oxford University Press.
- Purves S, Hadley G. 1976.** The Physiology of Symbiosis in *Goodyera repens*. *New Phytologist* **77**: 689–696.
- Qu Q, Lee S-J, Boos W. 2004.** TreT, a novel trehalose glycosyltransferring synthase of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *The Journal of biological chemistry* **279**: 47890–7.
- Ramon M, Rolland F, Thevelein JM, Van Dijck P, Leyman B, Rolland ÆF, Thevelein JM, Dijck ÆP Van. 2007.** ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on *Arabidopsis* growth and starch breakdown. *Plant Molecular Biology* **63**: 195–206.
- Rasmussen NH. 1990.** Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* (Rchb. f.) Hunt & Summerh. (Orchidaceae) during germination in vitro. *New Phytologist* **116**: 137–147.
- Rasmussen HN. 1992.** Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae): Requirements for germination and establishment of mycorrhiza. *Physiologia Plantarum* **86**: 161–167.
- Rasmussen HN. 1995.** *Terrestrial Orchids: From Seed to Mycotrophic Plant*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Rasmussen HN, Rasmussen FN. 2014.** Seedling mycorrhiza: A discussion of origin and evolution in Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **175**: 313–327.
- Ratnakumar S, Tunnacliffe A. 2006.** Intracellular trehalose is neither necessary nor sufficient for desiccation tolerance in yeast. *FEMS Yeast Research* **6**: 902–913.
- Reignault P, Cogan a., Muchembled J, Lounes-Hadj Sahraoui a., Durand R, Sancholle M. 2002.** Trehalose induces resistance to powdery mildew in wheat. *New Phytologist* **149**: 519–529.
- Renard-Merlier D, Randoux B, Nowak E, Farcy F, Durand R, Reignault P. 2007.** Iodur 40, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. *Phytochemistry* **68**: 1156–1164.
- Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud P-F, Lindquist EA, Kamisugi Y, et al. 2008.** The Physcomitrella Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants. *Science* **319**: 64–69.
- Richardson KA, Peterson RL, Currah RS. 1992.** Seed Reserves and Early Symbiotic Protocorm Development of *Platanthera-Hyperborea* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **70**: 291–300.
- Roitsch T, González MC. 2004.** Function and regulation of plant invertases: Sweet sensations. *Trends in Plant Science* **9**: 606–613.

- Sathiyadash K, Muthukumar T, Uma E, Pandey RR. 2012.** Mycorrhizal association and morphology in orchids. *Journal of Plant Interactions* **7**: 238–247.
- Selosse M-A, Le Tacon F. 1998.** The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology & Evolution* **13**: 15–20.
- Serrigny J, Dexheimer J. 1985.** Etude Ultrastructurale Tropicale : Localisation des Endomycorhizes Epidendrum ibaguense et des nucleosides Orchidee des ATPases diphosphatases Le but du present travail est de presenter une etude cytoenzymologique per mettant une approche , au niveau cell. *Cytologia* **50**: 779–788.
- Shaik S, Govender K, Leanya M. 2014.** GA3-mediated dormancy alleviation in the reputed African potato, *Hypoxis hemerocallidea*. *African journal of traditional, complementary and alternative medicine* **11**: 330–333.
- Shane MW, Feil R, Lunn JE, Plaxton WC. 2016.** Light-dependent activation of phospho *enol* pyruvate carboxylase by reversible phosphorylation in cluster roots of white lupin plants: diurnal control in response to photosynthate supply. *Annals of Botany* **118**: 637–643.
- Shapiro SS, Wilk MB. 1965.** An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika* **52**: 591.
- Schluepmann H, Dijken A Van, Aghdasi M, Wobbles B, Paul M, van Dijken A, Aghdasi M, Wobbles B, Paul M, Smeekens S. 2004.** Trehalose Mediated Growth Inhibition of Arabidopsis Seedlings Is Due to Trehalose-6-Phosphate Accumulation. *Plant physiology* **135**: 879–890.
- Schluepmann H, Pellny T, van Dijken A, Smeekens S, Paul M. 2003.** Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 6849–6854.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012.** NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**: 671–675.
- Silva MCP, Terra WR, Ferreira C. 2006.** Absorption of toxic β -glucosides produced by plants and their effect on tissue trehalases from insects. **143**: 367–373.
- Singh V, Louis J, Ayre BG, Reese JC, Shah J. 2011.** TREHALOSE PHOSPHATE SYNTHASE11-dependent trehalose metabolism promotes Arabidopsis thaliana defense against the phloem-feeding insect Myzus persicae. *Plant Journal* **67**: 94–104.
- Smith SE. 1966.** Physiology and Ecology of Orchid Mycorrhizal Fungi With Reference To Seedling Nutrition. *New Phytologist* **65**: 488–499.
- Smith SE. 1967.** Carbohydrate Translocation in Orchid Mycorrhizas. *New Phytologist* **66**: 371–378.
- Smith SE. 1973.** Asymbiotic germination of orchid seeds on carbohydrates of fungal origin. *New Phytologist* **72**: 497–499.
- Smith SE, Read DJ (David J. 2008.** *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press.
- Smith SE, Smith FA. 1973.** Uptake of glucose, trehalose and mannitol by leaf slices of the orchid Bletilla hyacinthina. *New Phytologist* **72**: 957–964.
- Soltis DE, Albert VA, Leebens-Mack J, Bell CD, Paterson AH, Zheng C, Sankoff D, DePamphilis CW, Wall PK, Soltis PS. 2009.** Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany* **96**: 336–348.
- Sommer J, Pausch J, Brundrett MC, Dixon KW, Bidartondo MI, Gebauer G. 2012.** Limited carbon and mineral nutrient gain from mycorrhizal fungi by adult Australian Orchids. *American Journal of Botany* **99**: 1133–1145.
- Song C, Guo J, Sun W, Wang Y. 2012.** Whole Genome Duplication of Intra- and Inter-chromosomes in the Tomato Genome. *Journal of Genetics and Genomics* **39**: 361–368.
- Sopalun K, Thammasiri K, Ishikawa K. 2010.** Micropropagation of the Thai orchid Grammatophyllum speciosum blume. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **101**: 143–150.
- Steinkellner S, Lenzemo V, Langer I, Schweiger P, Khaosaad T, Toussaint JP, Vierheilig H. 2007.** Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. *Molecules* **12**: 1290–1306.
- Stewart SL, Kane ME. 2010.** Effects of carbohydrate source on the in vitro asymbiotic seed germination of tin vitro he terrestrial orchid Habenaria macroceratidis. *Journal of Plant Nutrition* **33**: 1155–1165.
- Stimart DP, Ascher PD. 1981.** In vitro germination of Paphiopedilum seed on a completely defined medium. *Scientia Horticulturae* **14**: 165–170.
- Stø IM, Orr RJS, Fooyontphanich K, Jin X, Knutsen JMB, Fischer U, Tranbarger TJ, Nordal I, Aalen RB. 2015.** Conservation of the abscission signaling peptide IDA during Angiosperm evolution: withstanding genome duplications and gain and loss of the receptors HAE/HSL2. *Frontiers in Plant Science* **6**: 931.
- Stöckel M, Těšitelová T, Jersáková J, Bidartondo MI, Gebauer G. 2014.** Carbon and nitrogen gain during the growth of orchid seedlings in nature. *New Phytologist* **202**: 606–615.
- Streeter JG. 1985.** Accumulation of α,α -trehalose by Rhizobium bacteria and bacteroids. *Journal of Bacteriology* **164**: 78–84.
- Stribley DP, Read DJ. 1974.** The biology of mycorrhiza in the Ericaceae III. Movement of carbon from host to

fungus. *New Phytol* **73**: 73–74.

Strøm AR, Kaasen I. 1993. Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Molecular Microbiology* **8**: 205–210.

Su C I. C, Chao YTY-T, Yen SHS-H, Chen C-ICY, Chen W-CWC, Chang YCAY-CA, Shih MCM-C. 2013. Orchidstra: An Integrated Orchid Functional Genomics Database. *Plant & cell physiology* **54**: e11.

Sun Y, Skinner DZ, Liang GH, Hulbert SH. 1994. Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* **89**: 26–32.

Tamura K. 1992. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions When There Are Strong Transition-Transversion and G+C-Content Biases '. *Molecular biology and evolution* **9**: 678–687.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725–2729.

Tanaka M, Kikuchi A, Kamada H. 2008. Sugar signaling is involved in histone deacetylase-mediated repression of embryonic characteristics after germination. *Plant Biotechnology* **25**: 335–340.

Tatun N, Vajarasathira B, Tungjitwitayakul J, Sakurai S. 2014. Inhibitory effects of plant latex on trehalase activity and trehalase gene expression in the red flour beetle, *tribolium castaneum* (coleoptera: Tenebrionidae). *European Journal of Entomology* **111**: 11–18.

Tholalakabavi A, Zwiazek JJ, Thorpe T a. 1994. Effect of mannitol and glucose-induced osmotic stress on growth, water relations, and solute composition of cell suspension cultures of poplar (*Populus deltoides* var. Occidentalis) in relation to anthocyanin accumulation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **30**: 164–170.

Tian M, Wang F, Qian N, Sun A. 1985. In Vitro Seed Germination and Developmental Morphology of Seedling in *Cymbidium ensifolium*. *Acta Botanica Sinica* **27**.

Tsai WC, Fu CH, Hsiao YY, Huang YM, Chen LJ, Wang M, Liu ZJ, Chen HH. 2013. OrchidBase 2.0: Comprehensive collection of orchidaceae floral transcriptomes. *Plant and Cell Physiology* **54**: 1–8.

Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Botina SG, Netrusov AI. 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research* **162**: 69–76.

Tukey JW. 1949. Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *International Biometric Society* **5**: 99–114.

Tunnacliffe A, Lapinski J. 2003. Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **358**: 1755–1771.

Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, et al. 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**: 1596–604.

Valadares RBS, Perotto S, Santos EC, Lambais MR, Paper O. 2014. Proteome changes in *Oncidium sphacelatum* (Orchidaceae) at different trophic stages of symbiotic germination. *Mycorrhiza* **24**: 349–360.

Vandesteene L, Lopez-Galvis L, Vanneste K, Feil R, Maere S, Lammens W, Rolland F, Lunn JE, Avonce N, Beeckman T, et al. 2012. Expansive Evolution of the TREHALOSE-6-PHOSPHATE PHOSPHATASE Gene Family in *Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOLOGY* **160**: 884–896.

Veisova D, Macakova E, Rezabkova L, Sulc M, Vacha P, Sychrova H, Obsil T, Obsilova V. 2012. Role of individual phosphorylation sites for the 14-3-3-protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Biochemical Journal* **443**: 663–670.

Veluthambi K, Mahadevan S, Maheshwari R. 1981. Trehalose Toxicity in *Cuscuta reflexa*: Correlation with low trehalase activity. *Plant physiology* **68**: 1369–1374.

Veluthambi K, Mahadevan S, Maheshwari R. 1982a. Trehalose Toxicity in *Cuscuta reflexa*. *Plant physiology* **69**: 1247–1251.

Veluthambi K, Mahadevan S, Maheshwari R. 1982b. Trehalose Toxicity in *Cuscuta reflexa*: Sucrose content decreases in shoot tips upon trehalose feeding. *Plant physiology* **69**: 1247–1251.

Veluthambi K, Mahadevan S, Maheshwari R. 1982c. Trehalose Toxicity in *Cuscuta reflexa*: Cell Wall Synthesis Is Inhibited upon Trehalose Feeding. *Plant physiology* **70**: 686–688.

Veyret Y. 1974. Development of the Embryo and the Young Seedling Stages of Orchids. In: Withner, Carl L, ed. *The orchids: scientific studies*. John Wiley & Sons, 223–265.

Vogel G, Aeschbacher RA, Müller J, Boller T, Wiemken A, Mu J, Boller T, Wiemken A. 1998. Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast tps2 mutant. *The Plant Journal* **13**: 673–683.

Waes JM, Debergh PC. 1986. In vitro germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum*

67: 253–261.

Wagner W, Wiemken a, Matile P. 1986. Regulation of Fructan Metabolism in Leaves of Barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel). *Plant physiology* **81**: 444–447.

Wang H, Wang Z, Zhang F, Liu J, He X. 1997. A cytological study on the nutrient-uptake mechanism of a saprophytic orchid *Gastrodia elata*. *Acta Botanica Sinica* **39**: 500–504.

Wannet WJB, Hermans JHM, Van Der Drift C, Op Den Camp HJM. 2000. HPLC detection of soluble carbohydrates involved in mannitol and trehalose metabolism in the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 287–291.

Wannet WJB, Op HJM, Camp D, Wisselink HW, Drift C Van Der, Griensven LLD Van, Vogels GD, Op den Camp HJM, Wisselink HW, van der Drift C, et al. 1998. Purification and characterization of trehalose phosphorylase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1425**: 177–188.

WCSP. 2017. WCSP: World Checklist of Selected Plant Families: Royal Botanic Gardens, Kew. <http://www.ic-wcsp.org>. Accessed on: June - July 2017.

Welch BL. 1951. On the Comparison of Several Mean Values: An Alternative Approach. *Biometrika* **38**: 330.

Whigham DF, McCormick MK, O'Neil JP. 2008. Specialized seedling strategies II: orchids, bromeliads, carnivorous plants, and parasites. Seedling ecology and evolution. Cambridge: Cambridge University Press, 79–99.

Wiemken V. 2007. Trehalose synthesis in ectomycorrhizas--a driving force of carbon gain for fungi? *New phytologist* **174**: 228–30.

Wilcoxon F. 1945. Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics bulletin* **1**: 80–83.

Wilkinson KG, Dixon KW, Sivasithamparam K. 1989. Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids. *New Phytologist* **112**: 429–435.

Williams B, Njaci I, Moghaddam L, Long H, Dickman MB. 2015. Trehalose Accumulation Triggers Autophagy during Plant Desiccation. *PLoS Genetics* **11**: 1–17.

Williamson B, Hadley G. 1969. DNA content of nuclei in orchid protocorms symbiotically infected with *Rhizoctonia*. *Nature* **222**: 582–583.

Williamson B, Hadley G. 1970. Penetration an Infection of Orchid Protocorms by *Thanatephorus cucumeris* and Other *Rhizoctonia* Isolates. *Phytopathology* **60**: 1092–1096.

Wingler A, Fritzius T, Wiemken A, Boller T, Aeschbacher RA. 2000. Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *Apl3*, and starch synthesis in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **124**: 105–114.

Wisser G, Guttenberger M, Hampp R, Nehls U. 2000. Identification and of an characterization extracellular acid trehalase from the muscaria fungus ectomycorrhizal. *New Phytologist* **146**: 169–175.

Wolska-Mitaszko B, Molestak E, W. M. 2005. Properties of trehalase from different organs of alfalfa, *Medicago sativa*. *Acta Physiologiae Plantarum* **27**: 53–60.

Yadav UP, Ivakov A, Feil R, Duan GY, Walther D, Giavalisco P, Piques M, Carillo P, Hubberten HMH-M, Stitt M, et al. 2014. The sucrose-trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P. *Journal of Experimental Botany* **65**: 1051–1068.

Yang F, Chen S, Dai Z-M, Chen D-F, Duan R-B, Wang H-L, Jia S-N, Yang W-J. 2013. Regulation of trehalase expression inhibits apoptosis in diapause cysts of *Artemia*. *The Biochemical journal* **456**: 185–94.

Yang HL, Liu Y-JJ, Wang C-LL, Zeng Q-YY. 2012. Molecular evolution of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family in *Populus*, *Arabidopsis* and rice. *PLoS one* **7**: e42438.

Yates F. 1934. Contingency tables involving small numbers and the X2 test. *Supplement to the Journal of the Royal Statistical Society* **1**: 217–235.

Yobi A, Wone BWM, Xu W, Alexander DC, Guo L, Ryals JA, Oliver MJ, Cushman JC. 2012. Comparative metabolic profiling between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant species of *Selaginella* reveals insights into the resurrection trait. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **72**: 983–999.

Yobi A, Wone BWM, Xu W, Alexander DC, Guo L, Ryals JA, Oliver MJ, Cushman JC. 2013. Metabolomic profiling in *Selaginella lepidophylla* at various hydration states provides new insights into the mechanistic basis of desiccation tolerance. *Molecular Plant* **6**: 369–385.

Yoder JA, Zettler LW, Stewart SL. 2000. Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Science* **156**: 145–150.

Zhao X, Zhang J, Chen C, Yang J, Zhu H, Liu M, Lv F. 2014. Deep sequencing-based comparative transcriptional profiles of *Cymbidium hybridum* roots in response to mycorrhizal and non-mycorrhizal beneficial fungi. *BMC genomics* **15**: 747.

Zhao MM, Zhang G, Zhang DW, Hsiao YY, Guo SX. 2013. ESTs Analysis Reveals Putative Genes Involved in Symbiotic Seed Germination in *Dendrobium officinale*. *PLoS ONE* **8**: 1–10.

8. Přílohy

Příloha 1 – složení médií a roztoků

Zásobní roztoky pro přípravu médií

Zásobní roztoky solí

Pokud není uvedeno jinak, pak pro zásobní roztoky solí platí, že na finální objem byly doplněny destilovanou vodou a byly skladovány v chladničce při 4 °C.

Mo – objem 1 l

chemikálie	váha [g]
KH ₂ PO ₄	2,8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,8
CaCl ₂	2,0

MS-B – objem 0,5 l

chemikálie	váha [g]
KI	0,083
MnSO ₄ ·H ₂ O	1,690
H ₃ BO ₃	0,620
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,860
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0025
CoCl ₂	0,0013

Fe – objem 0,5 l

chemikálie	váha [g]
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2,78
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	3,73

RAM3_A – objem 1 l

chemikálie	váha [g]
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	2
KH_2PO_4	2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4

Zásobní roztoky vitamínů**MS-D** – objem 0,5 l, rozlito do 5ml nádobek a skladováno při -20 °C

chemikálie	váha [g]
inositol	10
kyselina nikotinová	0,05
pyridoxin – HCl	0,05
thiamin – HCl	0,05
glycin	0,2

ViMi – objem 100 ml, zmrazeno po 5 ml nádobkách při -20 °C

chemikálie	váha [g]
thiamin (HCl)	0,02
pyridoxin (HCl)	0,02
kyselina nikotinová	0,02
kyselina listová	0,02

Zásobní roztoky ostatních chemikálií**GA₃ + sacharóza**

- roztok sacharózy 20 mg/ml a GA₃ 1,25 mg/ml
- nejprve bylo v 0,5 ml 1M KOH rozpuštěno 12,5 mg GA₃ a 200 mg sacharózy, na finální objem 10 ml byl roztok doplněn destilovanou vodou

Kanamycin

- roztok 50mg/ml
- Kanamycin byl rozpuštěn v destilované vodě, roztok byl následně sterilizován filtrací a skladován v chladničce při 4 °C. Do média byl roztok přidán až po klávení, poté co médium zchladlo.

Validamycin A

- Roztok 10 mg /1 ml
- Validamycin A byl rozpuštěn v destilované vodě, roztok byl následně sterilizován filtrací a skladován v mrazáku při -20 °C. Do média byl roztok přidán až po klávení, poté co médium zchladlo.

Na-acetátový pufr

- 0,1 M roztok, pH 4,5, použita ultračistá voda
- roztok A a B byly připraveny odděleně
- roztok A: 0,2M octan sodný (CH_3COONa) – 200 ml
- roztok B: 0,2M kyselina chlorovodíková (HCl) – 200 ml
- do roztoku A byl umístěn pH metr a postupně přidáván roztok B do dosažení finálního pH
- uchovávalo při 4 °C v chladničce po maximálně 3 měsíce

Enzymatický roztok pro štěpení škrobu

- předpis pro zpracování přibližně 24 vzorků
- ve zkumavce bylo rozpuštěno 30 mg amyloglukosidázy a 30 mg α -amylázy ve 3 ml Na-acetátového pufru
- směs zvortexována
- roztok připraven vždy nejvýše hodinu před použitím

Roztoky pro histochemické metody

PVP-40

- jedna ze součástí fixáže (viz dále)
- 2 g PVP-40 (polyvinylpyrrolidon, průměrná molární hmotnost 40000 g/mol) rozpuštěn v 50 ml destilované vody za stálého míchání magnetickým míchadlem
- pH upraveno na 7 pomocí 0,2M KOH
- skladován zmražený

PFA

- jedna ze součástí fixáže (viz dále)
- 0,2 g PFA (paraformaldehyd) bylo v digestoři rozpuštěno v 50 ml destilované vody, na začátku míchání bylo pH upraveno na 9 pomocí 0,2M KOH, PFA se rozpouští při vysokém pH
- skladován zmražený

Fixáž

- smícháno 20 ml roztoku PVP-40 a 20 ml roztoku PFA
- pH upraveno na 7 pomocí 0,1M KOH
- do tohoto bodu lze roztok skladovat zmražený
- do 10 ml tohoto roztoku bylo přidáno 7,7125 g dithiothreitolu
- roztok s dithiothreitem musí být vždy připraven čerstvě před použitím

SoPo pufr

- 0,38M SoPo (z anglického sodium phosphate)
- nejprve připraveny dva roztoky, x a y
- x: 17,786 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rozpuštěno v 300 ml destilované vody
- y: 13,609 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ rozpuštěno v 100 ml destilované vody
- smíchání přibližně 263,1 ml roztoku x a 36,9 ml roztoku y
- pH upraveno na 6 pomocí roztoku x ($\text{pH} < 6$), nebo y ($\text{pH} > 6$)
- skladováno maximálně měsíc při teplotě 2 °C

DPI

- 0,2264 mg DPI (diphenyleneiodonium chlorid)/10 ml SoPo pufru
- připraven vždy čerstvě, udržován ve tmě, krátkodobě skladován ve tmě a při 2 °C

Roztok trehalózy

- 80 mg trehalózy/1 ml pufru SoPo
- připravován vždy čerstvý, krátkodobé skladování při 2 °C

GOX

- 100 jednotek, tj. 55 mg GOX (glukózaoxidáza, z druhu *Aspergillus niger*)/1 ml pufru SoPo
- připraven vždy čerstvě, udržován ve tmě, krátkodobě skladován ve tmě a při 2 °C

NBT

- 0,96 mg NBT (nitro blue tetrazolium)/1 ml pufru SoPo
- připraven vždy čerstvě, udržován ve tmě, krátkodobě skladován ve tmě a při 2 °C

PMS

- 0,56 mg PMS (fenazin methosulfát)/1 ml SoPo pufru
- připraven vždy čerstvě, udržován ve tmě, krátkodobě skladován ve tmě a při 2 °C

Kultivační média

Pokud není uvedeno jinak, pak pro kultivační média platí, že na finální objem byla doplněna destilovanou vodou.

BM1 – pH 5,8

- Dehydratovaná směs BM1 média byla zakoupena od firmy HiMedia Laboratories GmbH (Německo, Einhausen, Marie-Curie-Str. 3, 64683), a připravena podle příslušného protokolu s jedním rozdílem. Protokol uvádí, že měření pH má být provedeno ještě před doplněním roztoku média destilovanou vodou na finální objem. Takovýto postup by ovšem vedl ke změně výsledného pH a proto bylo pH změřeno až po doplnění na finální objem.

LB – objem 1 l, pH neupravováno, připravováno v tuhé (s přidaným agarem) i tekuté formě

chemikálie	váha [g]
Pepton	10
yeast extract	5
NaCl	10
kanamycin	0,05
(agar)	17,5

MoX – objem 1 l, pH 5,8

chemikálie	množství
MS-B	1,25 ml
Fe	1,25 ml
Mo	25 ml
ViMi	5 ml
sacharóza	10 g
Agar	7 g

Odsolovací médium – objem 100 ml

chemikálie	váha [g]
glukóza anhydrid, nebo glukóza hydrát	1,82/1,982
agaróza	1

SMS – 1 l, pH 5,8

chemikálie	množství
RAM3_A	20 ml
MS-B	2 ml
Fe	2 ml
MS-D	2 ml
casein enz. hydrolyzát	2 g
kyselina citronová	0,15 g
aktivní uhlí	0,5 g
agar	7 g

SMS modifikace – 1 l, pH 5,8, základ tvoří médium SM

označení	chemikálie	koncentrace	váha [g]
SMG	glukóza	100 mM	18
SMS	sacharóza	50 mM	17,12
SMT	trehalóza	50 mM	18,9
SMK	bez cukru	0	0
SMTV	trehalóza	50 mM	18,9
	validamycin A	150 µM	0,01866

SOC – 50 ml, sterilizováno filtrací

chemikálie	koncentrace	váha [g]
pepton	2 %	1
kvasničný extrakt	0,5 %	0,25
glukóza	0,20 mM	0,18
NaCl	10 mM	0,03
KCl	2,5 mM	0,009
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10 mM	0,10
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10 mM	0,12

X0 – 1 l, pH 5,8

chemikálie	váha [g]
Agar	7

Příloha 2

Seznam druhů pěstovaných v *in vitro* asymbiotických kulturách

označení kultury	druh	čeleď	podčeleď	tribus	subtribus
DM	<i>Diuris magnifica</i> D.L. Jones	Orchidaceae	Orchidoideae	Diurideae	Diuridineae
HYD	<i>Hypoxis decumbens</i> L.	Hypoxidaceae	-	-	-
HYP	<i>Hypoxis hemerocallidea</i> Fisch., C.A.Mey. & Avé-Lal	Hypoxidaceae	-	-	-
LUD	<i>Ludisia discolor</i> (Ker Gawl.) A.Rich	Orchidaceae	Orchidoideae	Cranichideae	Goodyerinae
NZ	<i>Neuwiedia zollingerii</i> var. <i>javanica</i> (J.J.Sm.) de Vogel	Orchidaceae	Apostasioideae	-	-
PB	<i>Paphiopedilum barbatum</i> (Lindl.) Pfitzer	Orchidaceae	Cypripediodeae	-	-
PN	<i>Paphiopedilum niveum</i> (Rchb.f) Stein	Orchidaceae	Cypripediodeae	-	-
PAUR	<i>Pauridia capensis</i> (L.) Snijman & Kocyan	Hypoxidaceae	-	-	-

PLM	<i>Pleione maculata</i> (Lindl.) Lindl.	Orchidaceae	Epidendriodeae	Arethuseae	Coelogyninae
TN	<i>Thelymitra nuda</i> R. Br	Orchidaceae	Orchidoideae	Diurideae	Thelymitrinae

Kultury *in vitro* – skladování, ošetření a doba kultivace

označení kultury	doba kultivace [dny]	ošetření	místnost
DM	171	tma, teplota 21-24 °C	A
HYD	31.3. 2017 - dosud	tma, teplota 21-24 °C	A
HYP1,2,3	6.8.2016 - dosud	tma, teplota 21-24 °C, od 27.3.2017 při teplotě 2-3 °C ve tmě	A/C
HYP4,5,6	31.8.2016 - dosud	tma, teplota 21-24 °C, od 27.3.2017 při teplotě 2-3 °C ve tmě	A/C
HYP7,8	4.4.2017 - dosud	tma, teplota 21-24 °C	A
LUD	65	tma, teplota 21-24 °C	A
NZ1	16.3.2016 - dosud	tma, teplota 21-24 °C	A
NZ2	17.8.2016 - dosud	tma, teplota 21-24 °C	A
PB	236	tma, teplota 21-24 °C	A
PN	152	tma, teplota 21-24 °C	A
PAUR1,2,3	6.8.2016 - dosud	tma, teplota 21-24 °C, od 27.3.2017 při teplotě 13 °C ve tmě	A/B
PAUR4,6,7	31.8.2016 - dosud	tma, teplota 21-24 °C, od 27.3.2017 při teplotě 13 °C ve tmě	A/B
PAUR7,8	4.4.2017 - dosud	tma, teplota 21-24 °C	A
PLM	140	tma, teplota 21-24 °C	A
TN	108	tma, teplota 21-24 °C	A

Označení místností viz tab. 3.1.

Seznam způsobů sterilizace semen a médií pro kultury HYP, HYD

a PAUR

mechanická skarifikace	ethanol	5% Ca(OCl)₂	3,5 % Na	médium
-	2 min	3 min	-	BM1, SMT, SMS
-	2 min	5 min	-	BM1, SMT, SMS
-	2 min	7 min	-	BM1, SMT, SMS
smirkový papír jemný	1 min	-	4 min	SMS, SMG, SMT, SMK
smirkový papír jemný + polystyren	1 min	-	4 min	SMS, SMG, SMT, SMK
smirkový papír jemný + stlačení pinzetou	1 min	4 min	-	SMS, SMG, SMT, SMK
prasknutí osemení svěrákem	1 min	4 min	-	SMS, SMG, SMT, SMK
prasknutí osemení svěrákem	1 min	6 min	-	SMS, SMG, SMT, SMK
prasknutí osemení svěrákem	1 min	8 min	-	SMS, SMG, SMT, SMK
smirkový papír hrubý	2 min	6 min	-	BMI1, MoX, X0

smirkový papír hrubý	2 min	8 min	-	BMI1, MoX, X0
smirkový papír jemný	1 min	-	4 min	SMS, SMG, SMT, SMK
smirkový papír jemný + polystyren	1 min	4 min	-	SMS, SMG, SMT, SMK
-	1 min	-	4 min	SMS, SMG, SMT, SMK
-	1 min	6 min	-	SMS, SMG, SMT, SMK
-	1 min	8 min	-	SMS, SMG, SMT, SMK
-	2 min	6 min	-	BMI1, MoX, X0
-	2 min	8 min	-	BMI1, MoX, X0

Seznam druhů pro experiment DNA1

označení	druh	čeleď	podčeleď	tribus	subtribus
BLP	<i>Blandfordia punicea</i> (Labill.) Sweet	Blandfordia - ceae	-	-	-
CUR	<i>Curculigo sp.</i>	Hypoxidacea e	-	-	-

CYCE	<i>Cyclopogon epiphyticus</i> (Dodson) Dodson	Orchidaceae	Orchidoideae	Cranichideae	Spiranthinae
ELO	<i>Elleanthus oliganthus</i> (Poepp. & Endl.) Rchb. f.	Orchidaceae	Epidendroideae	Sobralieae	-
HYPA	<i>Hypoxis aurea</i> Lour.	Hypoxidaceae	-	-	-
HYD	<i>Hypoxis decumbens</i> L.	Hypoxidaceae	-	-	-
LALA	<i>Lanaria lanata</i> (L.) T.Durand & Schinz	Lanariaceae	-	-	-
NZ	<i>Neuwiedia zollingerii</i> var. <i>javanica</i> (J.J.Sm.) de Vogel	Orchidaceae	Apostasioideae	-	-
PTEC	<i>Pterostylis curta</i> R.Br.	Orchidaceae	Orchidoideae	Diurideae	Pterostylinidae
SELA	<i>Selenipedium aequi- noctiale</i> Garay	Orchidaceae	Cypripedioideae	-	-
SICO	<i>Solenangis cornuta</i> (Rchb. f.) Summerh.	Orchidaceae	Epidendroideae	Vandae	Aerangidinae

STEW	<i>Stenoglottis woodii</i> Schltr.	Orchidaceae	Orchidoideae	Orchideae	-
VAP	<i>Vanilla aphylla</i> Blume	Orchidacea	Vanillodeae	Vanillae	-
VAFR	<i>Vanilla fragrans</i> Ames	Orchidacea	Vanillodeae	Vanillae	-
VAMA	<i>Vanilla madagas - cariensis</i> Rolfe	Orchidacea	Vanillodeae	Vanillae	-
VAPO	<i>Vanilla pompona</i> <u>Schiede</u>	Orchidacea	Vanillodeae	Vanillae	-
XERA	<i>Xerorchis amazonica</i> Schltr.	Orchidaceae	Epidendriodeae	Xerorchideae	-